

**Bildung bioaktiver Alkenale und Oxylipide durch eine
immobilisierte Hydroperoxid-Lyase sowie Enzyme des
Lipoxygenase-Weges aus Mungbohnen
(*Phaseolus radiatus* L.)**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Lebensmittelchemikerin
Bettina Rehbock

geboren am 21.10.1968
in Peine

Referent: Prof. Dr. R. G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. T. Scheper

Tag der Promotion: 12.06.1998

Datum der Veröffentlichung: Juli 1998

Die Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von Januar 1995 bis Dezember 1997 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. G. Berger durchgeführt.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. G. Berger für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit, seine vielfachen Anregungen und stete Diskussionsbereitschaft. Insbesondere danken möchte ich für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten am Institut sowie den mir zur Bearbeitung der Aufgaben gewährten großen Freiraum.

Herrn Dr. Ulrich Krings und Herrn Dr. Dietmar Ganßer sei dafür gedankt, daß sie jederzeit ein offenes Ohr für die kleineren und größeren Probleme des Laboralltags hatten, sowie für viele wertvolle Ratschläge. Hervorheben möchte ich den Beistand von Herrn Dr. Dietmar Ganßer bei der HPLC-MS und GC-MS-Analytik, der von außerordentlich großem Wert war.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Lebensmittelchemie, insbesondere aber meinem Labornachbarn Herrn Jens Onken, danke ich für den stets freundschaftlichen und hilfsbereiten Umgang sowie für zahlreiche anregende Diskussionen.

Für die Bereitstellung von Referenz-Massenspektren des 12,13- α - und 9,12- γ -Ketols der Linolsäure bin ich Dr. H. W. Gardner, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois 61604, zu Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich Dr. M. Hamberg, Karolinska Institutet, Department of Physiological Chemistry, 10401 Stockholm, Schweden, für wertvolle Hinweise zur Fragmentierung des 12,13- α - und 9,12- γ -Ketols der Linolensäure bei der GC-MS.

Darüber hinaus gilt meinen Eltern besonderer Dank, die auf ihre Art und Weise diese Arbeit in vielerlei Hinsicht unterstützt haben.

Zusammenfassung

Die in Pflanzen vorkommenden Enzyme des Lipoxygenase-Weges wurden zur Gewinnung des natürlichen Aromastoffs *2E*-Hexenal genutzt. Zu diesem Zweck wurde die durch Peroxidierung von Linolensäure mit der Lipoxygenase-1 aus Soja erhaltene 13-Hydroperoxy-9*Z*,11*E*,15*Z*-octadecatriensäure (13-HPOT) mit Homogenaten oder Rohextrakten aus Mungbohnenkeimlingen (*Phaseolus radiatus* L.) inkubiert. Während dieser Inkubation erfolgte die Spaltung von 13-HPOT durch die in Mungbohnen vorkommende Hydroperoxid-Lyase zu 3*Z*-Hexenal und 12-Oxo-9*Z*-dodecensäure, die nachfolgend zu den stabileren *trans*-Produkten isomerisierten.

Der Einfluß verschiedener Parameter wie z. B. pH-Wert, Substratkonzentration, Keimlingsalter, Inkubationszeit oder Detergenzkonzentration auf die Biosynthese der Zielverbindung wurde untersucht. Unter optimierten Reaktionsbedingungen wurden bei einer Konzentration von 30,5 mmol kg⁻¹ 13-HPOT als Maximum 1.070 mg kg⁻¹ *2E*-Hexenal und eine molare Umsatzrate von 33 % erhalten. Allerdings war die Umsatzrate bei geringeren Substratkonzentrationen weitaus höher (max. 87,4 %). Leinöl, ein nachwachsender Rohstoff mit einem hohen Gehalt an Linolensäure, erwies sich nach enzymatischer Hydrolyse als eine geeignete und kostengünstige Alternative zu reiner Linolensäure.

Die Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen wurde partiell aufgereinigt (ca. 300-fach), wobei als Trennschritte die Gelpermeationschromatographie, Ionenaustauschchromatographie und die Chromatographie an Hydroxylapatit verwendet wurden. Es handelt sich hierbei um ein membrangebundenes Enzym mit geringer Stabilität, das während einer 4-tägigen Lagerung (+4 °C) ca. 50 % der anfänglichen Aktivität verlor. Zur Erhöhung der Stabilität wurde die Hydroperoxid-Lyase kovalent auf unterschiedlichen kommerziell erhältlichen Gelen immobilisiert, womit erstmalig die Immobilisierung dieses Enzyms aus einer höheren Pflanze gelang.

Von den untersuchten Gelen besaß UltraLink Iodoacetyl die besten Kupplungseigenschaften. Als Höchstwert wurde eine Aktivität von 1,3 U mL⁻¹ Gel erhalten. Nach Optimierung der Kupplungsbedingungen wurden die Immobilisate hinsichtlich Temperatur- und Lagerstabilität (+4 °C) sowie Wiederverwendbarkeit mit dem freien Enzym verglichen. Während bei der Temperaturstabilität kein signifikanter Unterschied feststellbar war, wurde die Stabilität der Hydroperoxid-Lyase bei der Lagerung durch die Immobilisierung deutlich verbessert (Aktivität nach 18 d: 86 %). Da die Hydroperoxid-

Lyase durch das Hydroperoxid irreversibel inhibiert wurde, hing die Wiederverwendbarkeit des Immobilisates stark von der Substratkonzentration ab. Mit einer relativen Aktivität von 72,9 % (bezogen auf die Anfangsaktivität) nach drei Zyklen wurde bei einer Substratkonzentration von $1,65 \mu\text{mol mL}^{-1}$ Gel die geringste Inaktivierung beobachtet. Zur Verhinderung der Enzyminhibierung wurden verschiedene Additive (z. B. Thiole, Antioxidantien) eingesetzt, von denen Dithiothreitol einen stabilisierenden Effekt zeigte.

Weiterhin wurde die Bildung nichtflüchtiger Nebenprodukte durch andere 13-HPOT-metabolisierende Enzyme aus Mungbohnen untersucht. Hierzu wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die im Vergleich zur konventionellen GC-MS-Analytik auf umfangreiche Derivatisierungsprozeduren instabiler Verbindungen verzichten konnte. Die Metabolite wurden mittels HPLC-Particle Beam-MS identifiziert und mit einem Lichtstreu-Detektor (Evaporative Light-Scattering Detector, ELSD) quantifiziert, der auch die Detektion UV-inaktiver Verbindungen ermöglichte. Zahlreiche oxyfunktionalisierte Nebenprodukte wie 11-Hydroxy-12-oxo-9Z,15Z-octadecadiensäure, 12-Oxo-13-hydroxy-9Z,15Z-octadecadiensäure, 9-Hydroxy-12-oxo-10E,15Z-octadecadiensäure, 12-Oxo-phytodiensäure, 13-Hydroxy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure und 15,16-Epoxy-13-hydroxy-9Z,11E-octadecadiensäure wurden identifiziert, die auf die Anwesenheit einer Allenoxid-Synthase, Peroxygenase und evtl. Allenoxid-Cyclase zurückgeführt wurden. Der Anteil dieser auch als Oxylipide bezeichneten Verbindungen, die in Pflanzen wichtige physiologische Funktionen ausüben, am Metabolismus von 13-HPOT betrug unter den experimentellen Bedingungen maximal 13 %. Trotz der mit der HPLC-Methodik vorhandenen Möglichkeit, nichtflüchtige Reaktionsprodukte sowie das instabile Substrat quantifizieren zu können, verblieb ein Restanteil von nicht-identifizierbaren Konversionsprodukten von 13-HPOT.

Schlagworte:

Hydroperoxid-Lyase, Enzymimmobilisierung, Lipoxygenase-Weg

Summary

The enzymes of the lipoxygenase pathway of higher plants were used to generate the natural flavor compound 2*E*-hexenal. For this purpose, 13-hydroxyperoxy-9*Z*,11*E*,15*Z*-octadecatrienoic acid (13-HPOT), obtained by soybean lipoxygenase-1 catalyzed peroxidation of linolenic acid, was incubated with homogenates or crude extracts from mung bean seedlings (*Phaseolus radiatus* L.). During this incubation 13-HPOT was cleaved by the hydroperoxide lyase of mung beans into 3*Z*-hexenal and 12-oxo-9*Z*-dodecenoic acid which subsequently isomerized into the more stable *trans*-products.

The effect of various parameters, e. g. pH, substrate concentration, age of the seedlings, incubation time, and detergent concentration on the biosynthesis of the target compound were investigated. Under optimized reaction conditions a maximum of 1,070 mg kg⁻¹ 2*E*-hexenal and a molar conversion rate of 33 % was achieved at a concentration of 30.5 mmol kg⁻¹ 13-HPOT. However, the conversion rate was much better (max. 87.4 %) at a lower substrate concentration. Linseed oil, a renewable resource with a high content of linolenic acid, proved to be a suitable and cheap alternative to pure linolenic acid after enzymatic hydrolysis.

The hydroperoxide lyase of mungbeans was partially purified (300-fold) using gel permeation chromatography, ion exchange chromatography, and chromatography on hydroxyapatite as separation steps. It was an unstable, membrane-bound enzyme that lost 50 % of the initial activity after 4 days of storage at +4 °C. In order to increase the stability, the hydroperoxide lyase was covalently immobilized on different commercially available gels, which represented the first immobilization of this enzyme from a higher plant.

Of the gels investigated UltraLink Iodoacetyl possessed optimum coupling properties. A maximum activity of 1.3 U mL⁻¹ gel was obtained. After optimization of the coupling conditions, the immobilisates were compared to the soluble enzyme regarding temperature, storage stability (+4 °C), and re-usability. Whereas a significant difference of the temperature stability could not be observed, the stability of the hydroperoxide lyase during storage was notably improved by immobilization (activity after 18 d: 86 %). As the hydroperoxide lyase was inhibited irreversibly by the hydroperoxide, re-usability of the immobilisate depended strongly on the substrate concentration. The lowest degree of inactivation after three cycles, a relative activity of 72.9 % (related to the initial activity), was measured at a substrate concentration of 1.65 μmol mL⁻¹ gel. In order to pre-

vent the inhibition of the enzyme, different additives (e. g. thiols, antioxidants) were applied of which dithiothreitol showed a stabilizing effect.

Additionally, the generation of nonvolatile by-products by other 13-HPOT-metabolizing enzymes in mung beans was investigated. A HPLC method was developed which did not require sophisticated derivatization procedures of unstable compounds as required for conventional GC-MS analysis. The metabolites were identified by HPLC-particle beam-MS and quantified with an evaporative light-scattering detector (ELSD) that enabled also the detection of UV-inactive compounds. Various oxyfunctionalized by-products such as 11-hydroxy-12-oxo-9Z,15Z-octadecadienoic acid, 12-oxo-13-hydroxy-9Z,15Z-octadecadienoic acid, 9-hydroxy-12-oxo-10E,15Z-octadecadienoic acid, 12-oxo-phytodienoic acid, 13-hydroxy-9Z,11E,15Z-octadecatrienoic acid, and 15,16-epoxy-13-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid were identified and attributed to the presence of an allene oxide synthase, a peroxygenase, and possibly an allene oxide cyclase. The maximum proportion of these compounds, also called oxylipins, which serve important physiological functions in plants, to the metabolism of 13-HPOT was 13 %. Despite the improved analysis of non-volatile reaction products and the unstable substrate by HPLC, a remainder of non-identified 13-HPOT conversion products was not recovered from the reaction mixture.

Key words:

Hydroperoxide lyase, enzyme immobilization, lipoxygenase pathway

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Problemstellung	5
2. Ergebnisse	6
2.1. Anmerkungen zur Methodik und zur Auswahl des Pflanzenmaterials	6
2.2. Vergleich der Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal in Homogenaten aus Mungbohnen- und Luzernekeimlingen	7
2.3. Bildung von C ₆ -Aldehyden und C ₆ -Alkoholen aus endogenen Fettsäuren in Homogenaten aus Mungbohnenkeimlingen	8
2.4. Einfluß verschiedener Parameter auf die Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal aus 13-HPOT in Homogenaten aus Mungbohnenkeimlingen	11
2.4.1. Alter der Keimlinge und pH-Wert	11
2.4.2. Inkubationsdauer	14
2.4.3. Konzentration der Keimlinge	15
2.4.4. Substratkonzentration	16
2.4.5. Semikontinuierliche Substratzugabe	17
2.4.6. Überprüfung einer inhibierenden Wirkung von 2 <i>E</i> -Hexenal auf die Hydroperoxid-Lyase	18
2.5. Einfluß verschiedener Parameter auf die Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal aus 13-HPOT in Rohextrakten aus Mungbohnenkeimlingen	20
2.5.1. Herstellung eines Rohextraktes mit Hydroperoxid-Lyase-Aktivität	20
2.5.2. Dauer der Solubilisierung	21
2.5.3. Detergenzkonzentration	22
2.5.4. pH-Wert und Inkubationszeit	23
2.6. Enzymatische Synthese von 13(<i>S</i>)-Hydroperoxy-9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> ,15 <i>Z</i> -octadecatriensäure (13-HPOT)	24

2.7. Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal und Hexanal in einem mehrstufigen enzymatischen Verfahren aus Leinöl	27
2.7.1. Charakterisierung von Leinöl	27
2.7.2. Enzymatische Hydrolyse von Leinöl - Optimierung einiger Reaktionsparameter	28
2.7.3. Kombination der enzymatischen Einzelreaktionen	30
2.8. Partielle Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen	32
2.8.1. Versuche zur Verbesserung der Solubilisierungseffizienz	34
2.8.2. Abfolge der chromatographischen Trennschritte	36
2.8.2.1. Gelpermeationschromatographie (GPC)	36
2.8.2.2. Ionenaustauschchromatographie (IEC)	38
2.8.2.3. Chromatographie an Hydroxylapatit (HAC)	39
2.8.2.4. Bilanzierung der Enzymaufreinigung	40
2.8.3. Verkürzung der Enzymaufreinigung	41
2.8.4. Stabilität solubilisierter Hydroperoxid-Lyase	42
2.9. Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase	46
2.9.1. Vergleich unterschiedlicher Gele	46
2.9.2. Optimierung der Immobilisierungsbedingungen	48
2.9.2.1. Temperatur	48
2.9.2.2. pH-Wert	50
2.9.2.3. Proteinkonzentration	52
2.9.2.4. Detergenzkonzentration	54
2.9.3. Operationsstabilität immobilisierter Hydroperoxid-Lyase	57
2.9.3.1. Substratkonzentration	57
2.9.3.2. Antioxidantien	59
2.9.3.3. Eisen	61
2.9.3.4. Sorbitol	62
2.9.3.5. Thiole	63
2.9.4. Temperaturstabilität der Hydroperoxid-Lyase	64
2.9.5. Lagerstabilität immobilisierter Hydroperoxid-Lyase	66
2.9.6. Vergleich der Produktivität von Immobilisat und Solubilisat	68

2.10. GC-MS-Analytik nichtflüchtiger Metabolite	69
2.10.1. GC-MS-Analytik nach Methylierung	69
2.10.2. GC-MS-Analytik nach Darstellung der Methylester, O-Methyloxime und Trimethylsilylether	74
2.11. HPLC-Analytik nichtflüchtiger Metabolite	80
2.11.1. HPLC-Analytik der Oxylipide mit unterschiedlichen Detektions- systemen	82
2.11.2. Identifizierung der Oxylipide mittels HPLC-PB-MS (EI, CI)	84
2.11.3. Quantifizierung der Oxylipide mit dem ELSD	94
2.12. Einfluß verschiedener Parameter auf den Metabolismus von 13-HPOT in Rohextrakten aus Mungbohnenkeimlingen	98
2.12.1. Einfluß von Triton X-100	98
2.12.2. Einfluß der Inkubationstemperatur	101
2.12.3. Einfluß der Substratkonzentration	102
2.12.4. Einfluß von Ascorbinsäure	104
2.13. Metabolismus von 13-HPOT in unterschiedlichen Gemüsesorten	105
3. Diskussion	106
3.1. Der Lipoxygenase-Weg - Bildung bioaktiver C ₆ - und C ₉ -Verbindungen durch Pflanzen	106
3.1.1. Pflanzenphysiologische Bedeutung	106
3.1.2. Sensorische Eigenschaften der flüchtigen Produkte	107
3.1.3. Vorkommen und Eigenschaften pflanzlicher Lipoxygenasen und Hydroperoxid-Lyasen	109
3.2. Verwendung einer Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnenkeimlingen zur Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal	113
3.2.1. Alter der Keimlinge	114
3.2.2. pH-Optimum	115
3.2.3. Inkubationszeit	116
3.2.4. Substratkonzentration	117
3.2.5. Einsatz von Rohextrakten zur Gewinnung von 2 <i>E</i> -Hexenal	118
3.2.6. Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal und Hexenal aus Leinöl	120

3.3. Partielle Enzymaufreinigung und Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen	123
3.3.1. Partielle Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase	124
3.3.2. Immobilisierung von Enzymen	129
3.3.2.1. Unterschiedliche Immobilisierungsverfahren	130
3.3.3. Kovalente Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase	132
3.3.3.1. Stabilität und Produktivität immobilisierter Hydroperoxid-Lyase	137
3.4. Metabolismus von 13-HPOT durch weitere Enzyme des Lipoxygenase-Weges	144
3.4.1. GC-MS-Analytik der Oxylipide	144
3.4.2. Entwicklung einer HPLC-Methode zur Analytik der Oxylipide	147
3.4.3. Biogenese und pflanzenphysiologische Aufgaben der Oxylipide	155
3.5. Ausblick	161
4. Experimenteller Teil	164
4.1. Materialien und Chemikalien	164
4.1.1. Pflanzen	164
4.1.2. Lösungsmittel	164
4.1.3. Chemikalien	165
4.1.4. Enzyme	166
4.1.5. Gele für die Immobilisierung	166
4.1.6. Gase	167
4.1.7. Geräte	167
4.2. Analytik	168
4.2.1. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	168
4.2.2. Gaschromatographie (GC)	169
4.2.3. Gelchromatographie (GPC)	171
4.2.4. Chromatographie an Hydroxylapatit (HAC)	172
4.2.5. Ionenaustauschchromatographie (IEC)	172
4.2.6. UV/VIS-Spektroskopie	173
4.3. Derivatisierung	173
4.3.1. Methylierung	173

4.3.2.	Darstellung der O-Methyloxime	173
4.3.3.	Silylierung	174
4.4.	Synthesen	174
4.4.1.	Darstellung von 13-HPOT	174
4.4.2.	Darstellung von 13-HPOD	174
4.4.3.	Darstellung von <i>n</i> -Heptyljasmonat	175
4.5.	Verwendung von Leinöl als Ersatz für Linolensäure	175
4.5.1.	Charakterisierung von Leinöl	175
4.5.1.1.	Fettsäure-Verteilung	175
4.5.1.2.	Verseifungszahl	176
4.5.2.	Enzymatische Hydrolyse von Leinöl	176
4.5.3.	Quantifizierung der hydrolysierten Fettsäuren	177
4.6.	Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	177
4.6.1.	Keimung	177
4.6.2.	Herstellung, Inkubation und Extraktion der Homogenate	178
4.6.3.	Herstellung, Inkubation und Extraktion der Rohextrakte	179
4.6.4.	Solubilisierung der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnenkeimlingen	179
4.6.5.	Aufkonzentrierung chromatographischer Fraktionen	180
4.7.	Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase	180
4.7.1.	Vergleich der verschiedenen Gele	180
4.7.2.	Immobilisierung im Mikro-Ansatz	181
4.7.3.	Immobilisierung im Makro-Ansatz	181
4.8.	Methoden der Enzymanalytik	182
4.8.1.	Proteinbestimmung	182
4.8.1.1.	Assay nach Bradford (Bio-Rad Protein Assay)	182
4.8.1.2.	Assay nach Lowry (Bio-Rad DC Protein Assay)	183
4.8.2.	Bestimmung der Enzymaktivität	183
4.8.2.1.	GC-Assay	183
4.8.2.2.	UV-Assay	185
4.8.3.	Berechnung der Aktivitäts- und Kupplungseffizienz	185

4.9. Quantifizierung flüchtiger und nichtflüchtiger Produkte des Lipoxygenase-Weges	185
4.10. Hinweise zur Entsorgung	186
5. Literatur	187
6. Anhang	207

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Biogenese von C ₆ -Verbindungen im Verlauf des Lipoxygenase-Weges	2
Abb. 1-2	Biogenese von C ₉ -Verbindungen im Verlauf des Lipoxygenase-Weges	3
Abb. 2-1	Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal aus endogener Linolensäure in Abhängigkeit vom Keimlingsalter und pH-Wert	9
Abb. 2-2	Bildung von Hexenal aus endogener Linolsäure in Abhängigkeit vom Keimlingsalter und pH-Wert	10
Abb. 2-3	Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenol aus endogener Linolensäure in Abhängigkeit vom Keimlingsalter und pH-Wert	10
Abb. 2-4	pH-Optima der Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal und 2 <i>E</i> -Hexenol aus endogener Linolensäure durch 10 d alte Keimlinge	11
Abb. 2-5	Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal nach Zusatz von 13-HPOT (7,1-8,1 mmol kg ⁻¹) in Abhängigkeit vom Keimlingsalter und pH-Wert	12
Abb. 2-6	Molare Umsatzrate von 13-HPOT in Abhängigkeit vom Keimlingsalter und pH-Wert	13
Abb. 2-7	pH-Optimum der Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal aus 13-HPOT und endogener Linolensäure	13
Abb. 2-8	Zeitverlauf der Bildung von 3 <i>Z</i> - und 2 <i>E</i> -Hexenal	15
Abb. 2-9	Einfluß der Keimlingskonzentration auf die Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal	16
Abb. 2-10	Einfluß der Substratkonzentration auf die Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal	17
Abb. 2-11	Semikontinuierliche und diskontinuierliche Substratzugabe	18
Abb. 2-12	Überprüfung der Enzyminhibierung durch 2 <i>E</i> -Hexenal	19
Abb. 2-13	Herstellung eines Rohextraktes mit Hydroperoxid-Lyase-Aktivität	21
Abb. 2-14	Einfluß der Solubilisierungszeit auf die Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal in Rohextrakten	22
Abb. 2-15	Einfluß der Detergenzkonzentration auf die Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal in Rohextrakten	23
Abb. 2-16	Peroxidierung von Linolensäure (Semipräparativer Maßstab)	24
Abb. 2-17	UV-Spektrum von 13-HPOT	25
Abb. 2-18	Überprüfung der Reinheit von 13-HPOT mittels HPLC	26
Abb. 2-19	Verwendung von Leinöl zur Gewinnung von Grünnoten	27
Abb. 2-20	Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse von dem pH-Wert	29
Abb. 2-21	Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse von der Inkubationszeit	29

Abb. 2-22	Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal aus hydrolysiertem und peroxidiertem Leinöl	31
Abb. 2-23	Bildung von Hexenal aus hydrolysiertem und peroxidiertem Leinöl	31
Abb. 2-24	Schema der Aufarbeitung	33
Abb. 2-25	Verteilung von Protein und Hydroperoxid-Lyase-Aktivität bei der Aufarbeitung	34
Abb. 2-26	Schema der Enzymaufreinigung	36
Abb. 2-27	Gelpermeationschromatographie in Gegenwart von 0,1 % Triton X-100R	37
Abb. 2-28	Gelpermeationschromatographie ohne Triton X-100R	37
Abb. 2-29	Ionenaustauschchromatographie	38
Abb. 2-30	Chromatographie an Hydroxylapatit	39
Abb. 2-31	Ionenaustauschchromatographie (verkürzte Aufreinigung)	41
Abb. 2-32	Stabilität solubilisierter Hydroperoxid-Lyase in Abhängigkeit vom pH-Wert (Lagerung bei +4 °C)	43
Abb. 2-33	Stabilität solubilisierter Hydroperoxid-Lyase in Abhängigkeit vom pH-Wert (Lagerung bei -30 °C)	44
Abb. 2-34	Stabilität solubilisierter Hydroperoxid-Lyase in Anwesenheit verschiedener Additive (Lagerung bei -30 °C)	45
Abb. 2-35	Vergleich unterschiedlicher Gele mit Na-Citrat-Zusatz (0,4 M)	47
Abb. 2-36	Vergleich unterschiedlicher Gele ohne Na-Citrat-Zusatz	48
Abb. 2-37	Immobilisierung der Lyase bei +4 °C	49
Abb. 2-38	Immobilisierung der Lyase bei pH 7-9	50
Abb. 2-39	Immobilisierung der Lyase bei pH 5-8	51
Abb. 2-40	Immobilisierung bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in Gegenwart von 0,3 % Triton X-100R	53
Abb. 2-41	Immobilisierung bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in Gegenwart von 0,1-0,3 % Triton X-100R	54
Abb. 2-42	Einfluß von Triton X-100R (0,1-1,0 %) auf die Aktivitätseffizienz	55
Abb. 2-43	Einfluß von Triton X-100R-PC (0,075-0,3 %) auf die Aktivitätseffizienz	56
Abb. 2-44	Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (411-1148 µM)	58
Abb. 2-45	Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (55-411 µM)	58
Abb. 2-46	Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Antioxidantien	60

Abb. 2-47	Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Eisen(II) und Eisen(III)	61
Abb. 2-48	Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Sorbitol	62
Abb. 2-49	Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Thiolen	63
Abb. 2-50	Stabilität der Hydroperoxid-Lyase nach 0,5 h Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen (I)	65
Abb. 2-51	Stabilität der Hydroperoxid-Lyase nach 0,5 h Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen (II)	65
Abb. 2-52	Stabilität der Hydroperoxid-Lyase während der Lagerung bei 4 °C in Anwesenheit von 0,01 % Natriumazid	66
Abb. 2-53	Stabilität der Hydroperoxid-Lyase während der Lagerung bei 4 °C ohne Natriumazid	67
Abb. 2-54	GC-Chromatogramm nichtflüchtiger Metabolite (Methylester)	70
Abb. 2-55	GC-Massenspektrum (EI) von Peak 1: 12-Oxo-10 <i>E</i> -dodecensäure (Me)	71
Abb. 2-56	GC-Massenspektrum (EI) von Peak 4: 13-HOT (Me)	71
Abb. 2-57	GC-Massenspektrum (EI) von Peak 5: 12-oxo-PDA (Me)	72
Abb. 2-58	GC-Massenspektrum (EI) von Peak 6: 12,13- α -Ketol (Me)	73
Abb. 2-59	GC-Massenspektrum (EI) von Peak 7	74
Abb. 2-60	GC-Chromatogramm nichtflüchtiger Metabolite (Me, MO, TMS)	75
Abb. 2-61	GC-Massenspektrum (EI) von Peak 1 und 2: 12-Oxo-10 <i>E</i> -dodecensäure (Me, MO)	76
Abb. 2-62	GC-Massenspektrum (EI) von Peak 3: 13-HOT (Me, TMS)	77
Abb. 2-63	GC-Massenspektrum (EI) von Peak 4: 12-oxo-PDA (Me, MO)	77
Abb. 2-64	GC-Massenspektrum (EI) von Peak 5 und 6: 9,12- γ -Ketol (Me, MO, TMS)	78
Abb. 2-65	GC-Massenspektrum (EI) von Peak 7: 12,13- α -Ketol (Me, MO, TMS)	79
Abb. 2-66	HPLC-ELSD-Analytik der Oxylipide (Methylester)	81
Abb. 2-67	HPLC-Analytik der Oxylipide mit unterschiedlichen Detektionssystemen	83
Abb. 2-68	PB-Massenspektrum (CI) von Peak 3: 12-oxo-PDA (Me)	85
Abb. 2-69	PB-Massenspektrum (EI) von Peak 4: 11,12- α -Ketol (Me)	86
Abb. 2-70	PB-Massenspektrum (CI) von Peak 4: 11,12- α -Ketol (Me)	86
Abb. 2-71	PB-Massenspektrum (EI) von Peak 5: 12,13- α -Ketol (Me)	87

Abb. 2-72	PB-Massenspektrum (CI) von Peak 5: 12,13- α -Ketol (Me)	88
Abb. 2-73	GC-Chromatogramm von Fraktion 5: 12,13- α -Ketol (Me)	89
Abb. 2-74	PB-Massenspektrum (CI) von Peak 6: 13-HOT (Me)	89
Abb. 2-75	PB-Massenspektrum (EI) von Peak 7: 15,16-EHOD (Me)	90
Abb. 2-76	PB-Massenspektrum (CI) von Peak 7: 15,16-EHOD (Me)	91
Abb. 2-77	GC-Massenspektrum (EI) des fraktionierten Peaks 7 nach Trimethylsilylierung	92
Abb. 2-78	PB-Massenspektrum (EI) von Peak 8: 9,12- γ -Ketol (Me)	93
Abb. 2-79	PB-Massenspektrum (CI) von Peak 8: 9,12- γ -Ketol (Me)	93
Abb. 2-80	Zur Kalibrierung des ELSD verwendete Verbindungen	94
Abb. 2-81	Detektor-Response für Ricinolsäuremethylester bei unterschiedlicher Verstärkung (Gain) des Signals	95
Abb. 2-82	Vergleich der Eichgeraden von Ricinolsäuremethylester, 13-HPOT-Methylester und <i>n</i> -Heptyljasmonat	96
Abb. 2-83	Vergleich der Eichgeraden von Ricinolsäuremethylester, 13-HPOT-Methylester und <i>n</i> -Heptyljasmonat in doppelt-logarithmischer Auftragung	96
Abb. 2-84	HPLC-ELSD-Analytik: Einfluß von Triton X-100 auf den Metabolismus von 13-HPOT	99
Abb. 2-85	HPLC-PB-MS-Analytik der Oxylipide in unterschiedlichen Gemüsesorten nach Zusatz von 13-HPOT	105
Abb. 3-1	Bildung der 9(<i>S</i>)- und 13(<i>S</i>)-Hydroperoxide aus Linolsäure durch Lipoxygenasen (modifiziert nach [1])	110
Abb. 3-2	Katalytischer Zyklus der Lipoxygenase am Beispiel von Linolsäure [1]	122
Abb. 3-3	Immobilisierungsverfahren	130
Abb. 3-4	UltraLink Iodoacetyl	133
Abb. 3-5	Affi-Gel 10	133
Abb. 3-6	Affi-Gel 15	134
Abb. 3-7	UltraLink Biosupport Medium (Azlacton-Gruppe)	134
Abb. 3-8	Hypothetischer Mechanismus der Hydroperoxid-Lyase: Homolytische (A) und heterolytische (B) Spaltung von 13-HPOT	140
Abb. 3-9	Mögliche Tautomere des 12,13- α -Ketols (Methylester)	146
Abb. 3-10	Mögliches Tautomer des 9,12- γ -Ketols (Methylester)	146

Abb. 3-11	Schematische Darstellung der Vernebler- und Detektionseinheit des ELSD	148
Abb. 3-12	Der Oxylipid-Weg	156
Abb. 3-13	Hydrolyse des Allenoxids 12,13-EOT	157
Abb. 3-14	Zyklisierung des Allenoxids 12,13-EOT zu racemischer 12-oxo-PDA	158
Abb. 3-15	Intramolekularer (A) und intermolekularer (B) Reaktionsmechanismus der Peroxygenase (modifiziert nach [35])	159
Abb. 6-1	GC-Massenspektrum (EI) von 2 <i>E</i> -Hexenal	207
Abb. 6-2	GC-Massenspektrum (EI) von 3 <i>Z</i> -Hexenal	207

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1	Vergleich der Bildung von 2 <i>E</i> -Hexenal aus 13-HPOT bei Mungbohnen- und Luzernekeimlingen	8
Tab. 2-2	Fettsäure-Verteilung von Leinöl	28
Tab. 2-3	Einfluß von Triton X-100R auf die Solubilisierungseffizienz	35
Tab. 2-4	Einfluß der Zeitdauer auf die Solubilisierungseffizienz	35
Tab. 2-5	Bilanzierung der partiellen Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase	40
Tab. 2-6	Bilanzierung der partiellen Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase (verkürzte Aufreinigungsmethodik)	42
Tab. 2-7	Kupplungseffizienz verschiedener Gele mit Na-Citrat-Zusatz (0,4 M)	47
Tab. 2-8	Kupplungseffizienz verschiedener Gele ohne Na-Citrat-Zusatz	48
Tab. 2-9	Kupplungseffizienz bei +4 °C	49
Tab. 2-10	Kupplungseffizienz bei pH 7-9	51
Tab. 2-11	Kupplungseffizienz bei pH 5-8	52
Tab. 2-12	Kupplungseffizienz bei unterschiedlicher Protein- und Detergenzkonzentration	54
Tab. 2-13	Einfluß von Triton X-100R auf die Kupplungseffizienz	56
Tab. 2-14	Einfluß von Triton X-100R-PC auf die Kupplungseffizienz	57
Tab. 2-15	Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration	59
Tab. 2-16	Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Antioxidantien	60
Tab. 2-17	Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Eisen(II) und Eisen(III)	62
Tab. 2-18	Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Sorbitol	63
Tab. 2-19	Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Thiolen	64
Tab. 2-20	Vergleich der Produktivität von Immobilisat und Solubilisat	68
Tab. 2-21	Vergleich der Produktivität von Immobilisat und Solubilisat bezogen auf 1 kg Keimlinge	69
Tab. 2-22	Übersicht über die mittels HPLC-PB-MS und GC-MS identifizierten Verbindungen (Methylester)	94
Tab. 2-23	Vergleich der ELSD-Eichgeraden	97
Tab. 2-24	Einfluß von Triton X-100 auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 50 mL Puffer	100

Tab. 2-25	Einfluß von Triton X-100 auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 50 mL Rohextrakt	100
Tab. 2-26	Einfluß der Inkubationstemperatur auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 2 × 50 mL Puffer	101
Tab. 2-27	Einfluß der Inkubationstemperatur auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 2 × 50 mL Rohextrakt	102
Tab. 2-28	Einfluß der Substratkonzentration auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 50 mL Puffer	103
Tab. 2-29	Einfluß der Substratkonzentration auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 50 mL Rohextrakt	103
Tab. 2-30	Einfluß von Ascorbinsäure auf den Metabolismus von 13-HPOT	104
Tab. 3-1	Physiologische Eigenschaften einiger Produkte des Lipoxyge- nase-Weges	107
Tab. 3-2	Sensorische Eigenschaften einiger C ₆ - und C ₉ -Verbindungen	108
Tab. 3-3	Regiospezifität und pH-Optima der Lipoxygenasen in unter- schiedlichen Pflanzen	110
Tab. 3-4	Regio- und Stereospezifität ausgewählter Lipoxygenasen [10]	111
Tab. 3-5	Substratspezifität der Hydroperoxid-Lyase in unterschiedlichen Pflanzen	113
Tab. 3-6	In biotechnologischen Verfahren maximal erzielte Gehalte für 2 <i>E</i> -Hexenal	117
Tab. 4-1	Verwendete Lösungsmittel	164
Tab. 4-2	Verwendete Chemikalien	165
Tab. 4-3	Verwendete Enzyme	166
Tab. 4-4	Verwendete Gele	166
Tab. 4-5	Verwendete Gase	167
Tab. 4-6	Verwendete Geräte	167

Abkürzungsverzeichnis

AHD	Alkohol-Dehydrogenase
AOC	Allenoxid-Cyclase
AOS	Allenoxid-Synthase
BSA	Bovine (Rinder) Serumalbumin
BW	Blindwert
C18:2	Linolsäure
C18:3	Linolensäure
CI	Chemische Ionisierung
CMC	Critical Micellar Concentration (Kritische Mizellenkonzentration)
DAD	Diodenarray-Detektor
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
15,16-EHOD	15,16-Epoxy-13-hydroxy-9Z,11E-octadecadiensäure
EI	Elektronenstoß-Ionisierung
ELSD	Evaporative Light-Scattering Detector (Lichtstreu-Detektor)
12,13-EOT	12,13-Epoxy-9Z,11,15Z-octadecatriensäure
eV	Elektronenvolt
F	Fraktion
FID	Flammenionisations-Detektor
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HAC	Chromatographie an Hydroxylapatit
13-HOT	13-Hydroxy-9Z,11E-15Z-octadecatriensäure
HPL	Hydroperoxid-Lyase
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
9-HPOD	9-Hydroperoxy-10E,12Z-octadecadiensäure
9-HPOT	9-Hydroperoxy-10E,12Z-15Z-octadecatriensäure
9- γ -HPOT	9-Hydroperoxy-6Z,10E,12Z-octadecatriensäure
13-HPOD	13-Hydroperoxy-9Z,11E-octadecadiensäure
13-HPOT	13-Hydroperoxy-9Z,11E-15Z-octadecatriensäure
13- γ -HPOT	13-Hydroperoxy-6Z,9Z,11E-octadecatriensäure

IEC	Ion Exchange Chromatography (Ionenaustauschchromatographie)
ISO	Isomerase
IStd	Interner Standard
kDa	Kilo Dalton
11,12- α -Ketol	11-Hydroxy-12-oxo-9Z,15Z-octadecadiensäure
12,13- α -Ketol	12-Oxo-13-hydroxy-9Z,15Z-octadecadiensäure
9,12- γ -Ketol	9-Hydroxy-12-oxo-10E-15Z-octadecadiensäure
LOX	Lipoxygenase
M	mol L ⁻¹ (Stoffmengenkonzentration)
Me	Methylester
MO	O-Methyloxim
MSTFA	Trimethylsilyltrifluoracetamid
m/v	bei Prozentangaben: Masse pro Volumen
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
NAD	Nicotinadenindinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinadenindinucleotid, reduziert
12-oxo-PDA	12-Oxo-phytodiensäure
PB-MS	Particle Beam-Massenspektrometrie
pl	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxygenase
ppb	parts per billion (10 ⁻⁹)
R _f	Retentionsfaktor
RP ₁₈	<i>n</i> -Octadecyl-silanisiertes Kieselgel, Umkehrphasen-Material der HPLC
RT	Raumtemperatur
TMS	Trimethylsilylether
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (1 Unit = 1 μ mol min ⁻¹)
UF	Ultrafiltration
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
v/v	bei Prozentangaben: Volumen pro Volumen

1. Einleitung

In Pflanzen werden im Verlauf des Lipoxygenase-Weges aus mehrfach ungesättigten C₁₈-Fettsäuren oxyfunktionalisierte Derivate und kurzkettige Spaltprodukte generiert, die zahlreiche bioaktive Eigenschaften aufweisen [1, 2]. Zu den wichtigsten Aufgaben der gebildeten Produkte zählen die Beteiligung an der pflanzlichen Abwehr sowie regulatorische Funktionen [2]. Vielfach wird der Lipoxygenase-Weg mit der Arachidonsäure-Kaskade in Tieren verglichen, die ebenfalls eine Oxyfunktionalisierung umfaßt und zur Bildung der physiologisch wirksamen Eicosanoide wie Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene führt [3, 4].

Die Aktion der am Lipoxygenase-Weg beteiligten Enzyme wird durch eine Verletzung des pflanzlichen Gewebes, beispielsweise durch Windbruch, Insekten oder phytopathogene Mikroorganismen, initiiert [3]. Hierbei wird die Kompartimentierung in den beschädigten Zellen aufgehoben, was einen ungehinderten Kontakt von Enzymen und Substraten ermöglicht. An dieser Stelle wird zunächst nur die Biogenese der kurzkettigen Spaltprodukte beschrieben (Abb. 1-1, Abb. 1-2), während auf die oxyfunktionalisierten Metabolite später detaillierter eingegangen wird (vgl. 3.4.3.).

Als erste enzymatische Reaktion des Lipoxygenase-Weges erfolgt die Hydrolyse von Membranlipiden durch (Phospho-) Lipasen. Von den freigesetzten Fettsäuren werden solche, die ein 1Z,4Z-Pentadien-System besitzen (Linol-, Linolensäure), nachfolgend durch Lipoxygenasen peroxidiert [5]. Im Gegensatz zu Autoxidationsprozessen verläuft die enzymatische Bildung der Hydroperoxy-Fettsäuren in hohem Maß stereospezifisch. Nach Abstraktion des pro(S)-Protons vom C₁₁ des Fettsäuremoleküls findet die Insertion von molekularem Sauerstoff, in Abhängigkeit von der Pflanzenspezies, entweder am C₉ oder C₁₃ des intermediär auftretenden Pentadienylradikals statt [1].

Hydroperoxid-Lyasen spalten anschließend die Hydroperoxy-Fettsäuren in einen Aldehyd und eine ω-oxo-Carbonsäure [6, 7]. Auf diese Weise entstehen aus 13-Hydroperoxy-9Z,11E-15Z-octadecatriensäure 3Z-Hexenal bzw. aus 13-Hydroperoxy-9Z,11E-octadecadiensäure Hexenal sowie 12-Oxo-9Z-dodecensäure (Abb. 1-1). Analog werden zusätzlich zu 9-Oxo-nonansäure aus 9-Hydroperoxy-10E,12Z-15Z-octadecatriensäure 3Z,6Z-Nonadienal und aus 9-Hydroperoxy-10E,12Z-octadecadiensäure 3Z-Nonenal gebildet (Abb. 1-2).

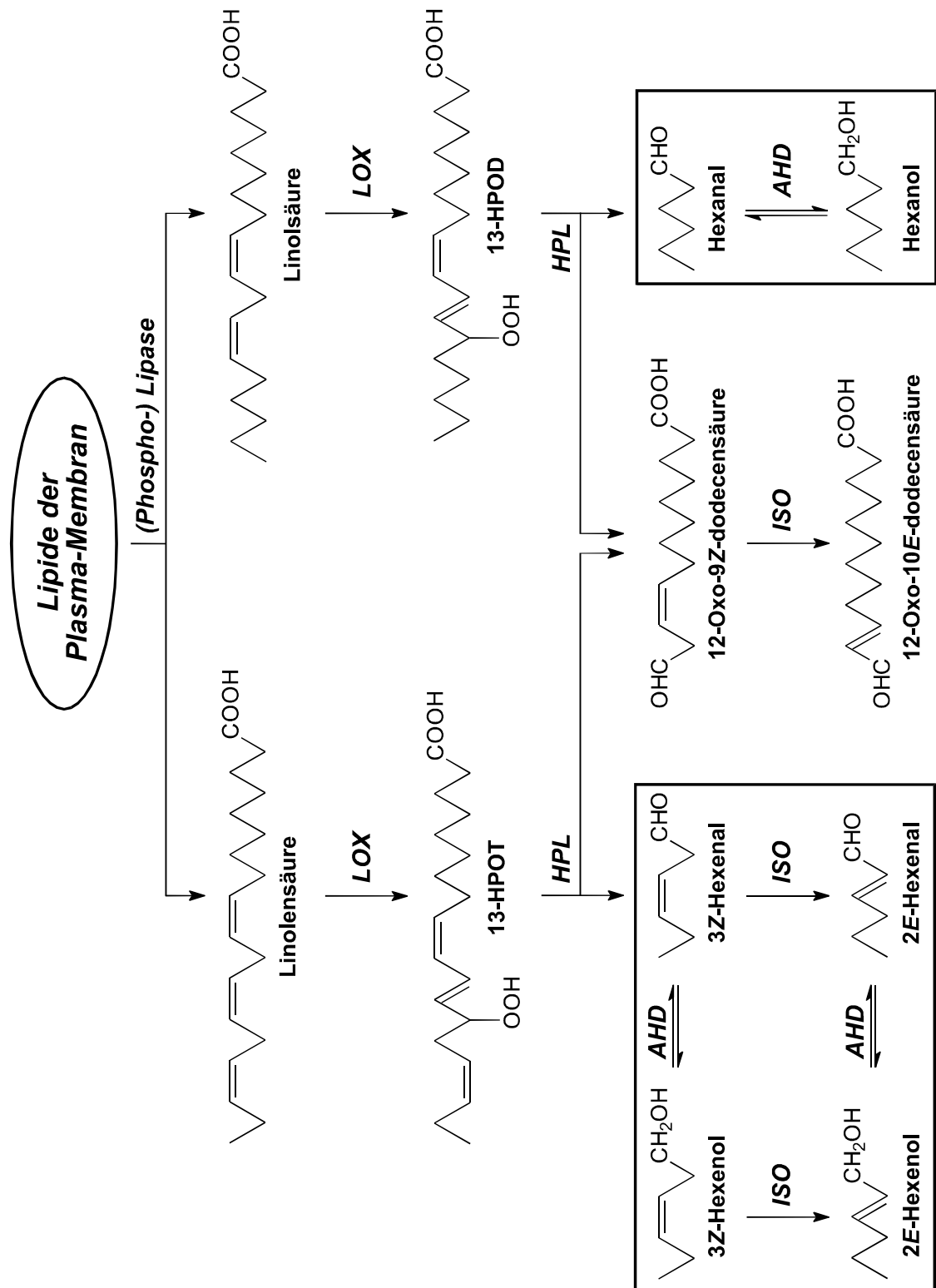


Abb. 1-1: Biogenese von C₆-Verbindungen im Verlauf des Lipoxygenase-Weges.
 LOX: Lipoxygenase, HPL: Hydroperoxid-Lyase, AHD: Alkohol-Dehydrogenase,
 ISO: Isomerase, 13-HPOT: 13-Hydroperoxy-9Z,11E-15Z-octadecatriensäure,
 13-HPOD: 13-Hydroperoxy-9Z,11E-octadecadiensäure.

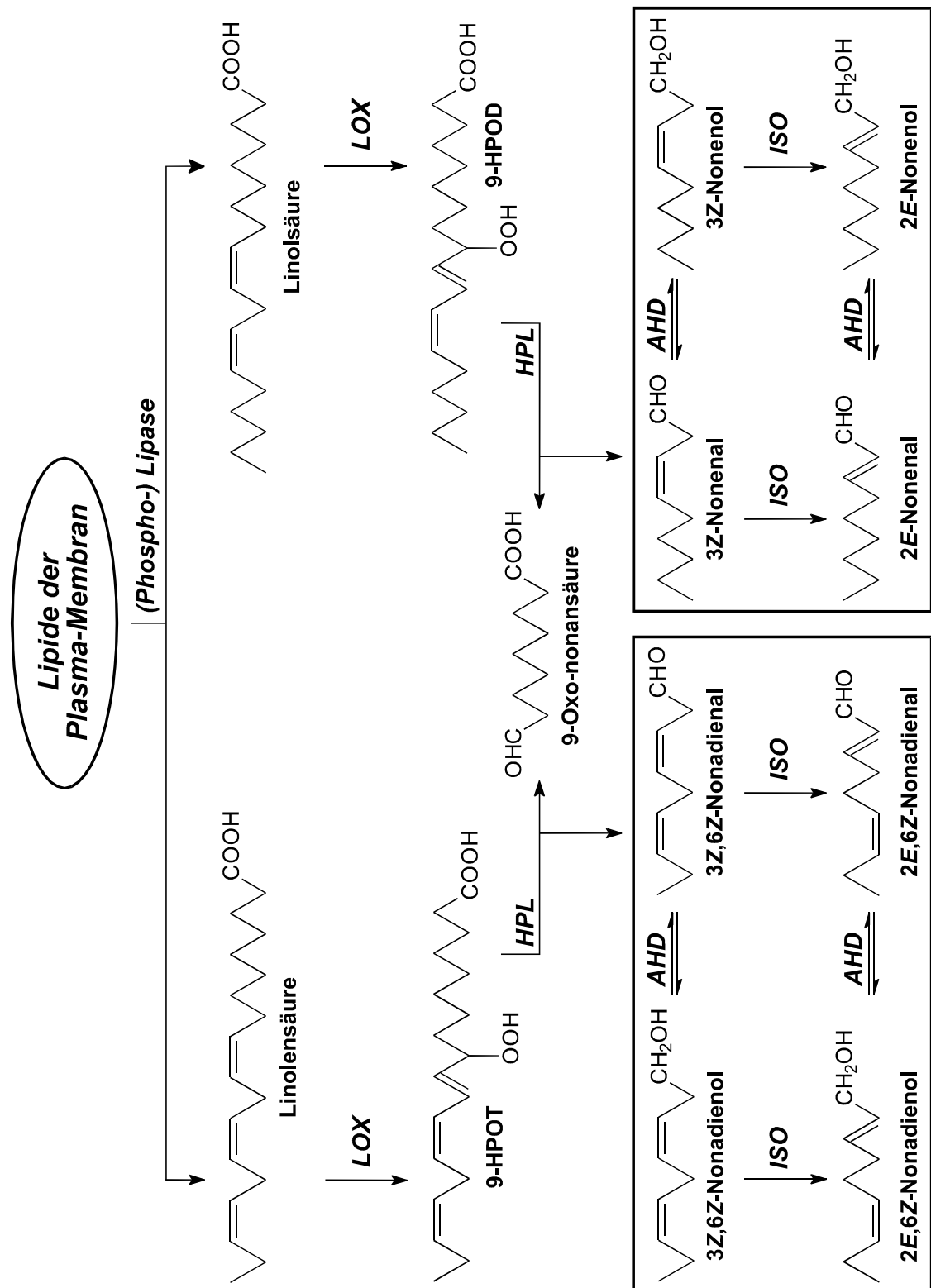


Abb. 1-2: Biogenese von C₉-Verbindungen im Verlauf des Lipoxygenase-Weges.
 LOX: Lipoxygenase, HPL: Hydroperoxid-Lyase, AHD: Alkohol-Dehydrogenase,
 ISO: Isomerase, 9-HPOT: 9-Hydroperoxy-10E,12Z-15Z-octadecatriensäure,
 9-HPOD: 9-Hydroperoxy-10E,12Z-octadecadiensäure.

Die Primärfragmente der Hydroperoxidspaltung sind keine stabilen Endprodukte des Lipoxygenase-Weges, sondern unterliegen zum Teil weiteren enzymatischen Modifikationen. Verbindungen, die eine 3Z-Enal-Struktur aufweisen, isomerisieren chemisch, aber auch enzymatisch rasch in die stabilere 2E-Form [8]. Außerdem können die Aldehyde durch Alkohol-Dehydrogenasen zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert werden [6]. Inwieweit diese Modifikationen stattfinden, hängt jedoch von der Präsenz dieser Enzyme in den einzelnen Pflanzenspezies ab, so daß jede Pflanze über ein charakteristisches Produktspektrum verfügt.

Da die gebildeten C₆- und C₉-Aldehyde und Alkohole niedrige Geruchsschwellenwerte mit angenehm frischen, grünen (C₆) oder gurkenähnlichen (C₉) Geruchseindrücken vereinen (vgl. 3.1.2.), prägt der Lipoxygenase-Weg das Aroma vieler Gemüsesorten und Früchte in entscheidender Weise [9, 10]. Infolge ihrer sensorischen Eigenschaften werden die C₆-Verbindungen auch als Grünnoten bezeichnet [11].

Verluste an natürlich vorkommenden Aromastoffen bei der Verarbeitung, Lagerung oder Transport bedingen ebenso eine Aromatisierung von Lebensmitteln wie die Produktion besonders aromaintensiver Lebensmittelzubereitungen. Weil der Verbraucher allen chemischen Zusätzen, also auch chemisch synthetisierten Aromastoffen, zu einem Lebensmittel mißtraut oder sie sogar ablehnt, werden im Lebensmittelsektor anders als bei den Duft- und Riechstoffen im Kosmetik- oder Waschmittelbereich fast ausschließlich natürliche Aromastoffe verwendet.

Während beispielsweise 2E-Hexenal und 2E-Hexenol industriell in einem großen Maßstab von 50 t a⁻¹ bzw. 250 t a⁻¹ produziert werden [12], beläuft sich der Markt für natürliche Grünnoten jährlich auf ungefähr 5-10 t mit einem Marktpreis von 4.000-5.000 SFr kg⁻¹ (ca. 4.900-6.150 DM kg⁻¹) [13]. Dem stetig wachsenden Bedarf an natürlichen C₆-Verbindungen steht jedoch die begrenzte Verfügbarkeit der Rohstoffe gegenüber. So werden Grünnoten aus agronomischen Abfallmaterialien isoliert oder bei der fraktionierten Destillation ätherischer Öle als Nebenprodukte erhalten, wobei traditionell Minzöl (*Mentha arvensis*) als natürliche Quelle dient [13, 14]. Die Knappheit natürlicher Ressourcen sowie die ständige Gefahr von Variationen in der Qualität des Ausgangsmaterials stellen die Aromenindustrie vor die herausfordernde Aufgabe, alternative Wege zur Gewinnung von natürlichen Grünnoten zu erschließen [14].

1.1. Problemstellung

Der Begriff des „natürlichen Aromastoffes“ ist in Deutschland entsprechend der Vorgabe einer EU-Richtlinie aus 1988 in der Aromenverordnung gesetzlich geregelt. Hiernach sind natürliche Aromastoffe „chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, gewonnen durch geeignete physikalische Verfahren (einschließlich Destillation und Extraktion mit Lösungsmitteln), durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die als solche verwendet oder mittels herkömmlicher Lebensmittelzubereitungsverfahren (einschließlich Trocknen, Rösten und Fermentieren) für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden“ [15].

Da laut obiger Begriffsdefinition auch enzymatische Verfahren zur Gewinnung natürlicher Aromastoffe zulässig sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die Nutzung der am Lipoxygenase-Weg beteiligten Enzyme und deren Einbindung in einen integrierten Prozeß eine Alternative zur konventionellen Vorgehensweise darstellt, um Grünnoten in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen. Im einzelnen sollten folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- Entwicklung eines enzymatischen Verfahrens unter Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen zur Gewinnung der natürlichen Aromastoffe 3Z-/2E-Hexenal,
- Optimierung der einzelnen Enzymreaktionen (Lipase, Lipoxygenase, Hydroperoxid-Lyase) im Hinblick auf maximale Produktmengen,
- Isolierung der Hydroperoxid-Lyase aus einem geeigneten Pflanzenmaterial,
- Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase und Charakterisierung der erhaltenen Immobilisate,
- Untersuchung von enzymatischen und nichtenzymatischen Nebenreaktionen sowie Identifizierung von auftretenden Produkten.

2. Ergebnisse

2.1. Anmerkungen zur Methodik und zur Auswahl des Pflanzenmaterials

Gemäß den Anforderungen der Aromenverordnung sind zur Gewinnung von natürlichem 2*E*-Hexenal die Isolierung aus einem an C₆-Verbindungen reichen Pflanzenmaterial oder biotechnologische Verfahren, die die am Lipoxygenase-Weg beteiligten Enzyme nutzen, anwendbar. Obwohl die Enzyme des Lipoxygenase-Weges in Pflanzen weit verbreitet sind, mußte bei der Auswahl eines geeigneten Pflanzenmaterials beachtet werden, daß die Aktivität der Enzyme in vielen Arten unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann (vgl. 3.1.3.) [16].

Aber selbst eine hohe Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase-Aktivität waren an sich noch keine Garantie für eine hohe Produktion von C₆-Aldehyden. Weitere Parameter wie der Anteil von Linol- und Linolensäure in den Lipiden, Aktivität der (Phospho-) Lipase sowie Substrat- und Regiospezifität der Lipoxygenase bzw. Hydroperoxid-Lyase spielten ebenfalls eine wichtige Rolle, so daß die aus endogen Lipiden gebildete Konzentration an Grünnoten meistens sehr gering war.

Um höhere Ausbeuten zu erzielen, ist der Zusatz eines exogenen Substrates unerlässlich. Bisherige biotechnologische Ansätze zur Produktion von natürlichen Grünnoten beinhalteten z. B. die Inkubation von Pflanzenhomogenaten mit Fettsäuren [17, 18, 19] oder mit deren Hydroperoxiden [11, 13, 14]. Agronomische Abfallprodukte und andere preisgünstige Ausgangsmaterialien wie z. B. Apfelschalen [18], Apfeltrester [19], Melonenblätter [20] und Gräser [17] wurden häufig als Enzymquellen verwendet.

Gemäß dem in der Einleitung beschriebenen Biogenese-Weg erfordert die Bildung von 2*E*-Hexenal eine Lipoxygenase, die die Peroxidierung am C₁₃ von Linolensäure katalysierte, und eine Hydroperoxid-Lyase mit einer Substratspezifität für 13(*S*)-Hydroperoxide. Als Lipoxygenase wurde das Isoenzym-1 (LOX-1) aus Soja ausgewählt, da es eine hohe Regio- und Stereospezifität für das 13(*S*)-Hydroperoxid aufwies und zudem noch kommerziell erhältlich war [21, 22, 23, 24]. Die Verwendung einer isolierten Lipoxygenase schaffte die Voraussetzung für die Trennung beider enzymatischen Teilreaktionen. Dies war insofern von Vorteil, da auf diese Weise beide Reaktionen separat optimiert werden konnten. Das in dem ersten Schritt hergestellte 13-HPOT wurde nachfolgend als Substrat für die Hydroperoxid-Lyase eingesetzt.

Die Pflanze, die als Ausgangsmaterial für die Hydroperoxid-Lyase dienen sollte, mußte neben einer hohen Enzymaktivität ein weiteres Kriterium erfüllen: ganzjährige Verfügbarkeit bei möglichst konstanter Qualität. Somit schieden nur saisonal erhältliche Gemüsesorten oder Abfallprodukte wie z. B. Melonenblätter, die bei der Melonenernte in großen Mengen anfallen und im Erzeugerland auch zur Produktion von Grünnoten genutzt werden, trotz ihrer hohen Hydroperoxid-Lyase-Aktivität aus [20].

In einer früheren Arbeit wurde in einem Screening unterschiedlicher Pflanzen bei Mungbohnenkeimlingen (*Phaseolus radiatus* L.) ein hohes Bildungspotential für 2E-Hexenal festgestellt [25]. Untersuchungen zur Abhängigkeit der Aromastoffbildung von der Substratkonzentration ergaben bei 11,7 mM Linolensäure 528 mg kg⁻¹ 2E-Hexenal, allerdings betrug die Umsatzrate nur 2,6 %. Niedrige Umsatzraten wurden auch in anderen Arbeiten beobachtet und zwar immer dann, wenn Fettsäuren als Substrate benutzt wurden [17, 18, 19]. Der Einsatz von Hydroperoxiden stellte hierzu eine sinnvollere Alternative dar. Aufgrund der im Vergleich zu Linolensäure größeren Löslichkeit von 13-HPOT in wäßrigen Puffersystemen wurde eine bessere Verfügbarkeit für die Hydroperoxid-Lyase und somit ein höherer Umsatz erwartet.

2.2. Vergleich der Bildung von 2E-Hexenal in Homogenaten aus Mungbohnen- und Luzernekeimlingen

Zur Selektion geeigneter Pflanzen mit hoher Hydroperoxid-Lyase-Aktivität sollte die Bildung von 2E-Hexenal aus 13-Hydroperoxy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure (13-HPOT) in Homogenaten aus Mungbohnen-, Luzerne- und Wassermelonenkeimlingen verglichen werden (vgl. 4.6.1., 4.6.2.). Es ließen sich jedoch nur Keimlinge aus den beiden zuerst genannten Pflanzen problemlos heranziehen, während die Anzucht von Melonenkeimlingen aufgrund eines sehr langsamen Wachstums und starken Schimmelbefalls erfolglos war. Die Keimdauer betrug 6 d, da über diesen Zeitpunkt hinaus die Luzerne kaum noch wuchs und infolge fehlender Nährstoffzufuhr langsam einging. Durch Blindwerte (Homogenat ohne 13-HPOT) wurde die aus endogener Linolensäure gebildete Konzentration an 2E-Hexenal ermittelt und bei der Berechnung der molaren Umsatzrate berücksichtigt.

In Homogenaten aus Mungbohnenkeimlingen wurde mit 238 mg kg⁻¹ um den Faktor 2,6 mehr 2E-Hexenal gebildet als durch Luzernekeimlinge (Tab. 2-1). Während durch Luzernekeimlinge nur 22,3 % des eingesetzten Substrates zu 2E-Hexenal umgesetzt

wurden, betrug die Umsatzrate bei Mungbohnen 51,2 %. Mit älteren Luzernepflanzen, die von einem Feld geerntet wurden, lagen die Umsatzzraten im Bereich von 5-30 %. Vermutlich rührten diese starken Schwankungen daher, daß die eingesetzte Probenmenge von 5 g der Heterogenität des Pflanzenmaterials nicht ausreichend gerecht wurde. Dieser Versuch verdeutlichte, daß in Mungbohnenkeimlingen eine 13-Hydroperoxy-Fettsäuren spaltende Lyase vorhanden war, die dem entsprechenden Enzym aus Luzerne, einer Pflanze mit literaturbekannt hoher Hydroperoxid-Lyase-Aktivität [11], deutlich überlegen war.

Tab. 2-1: Vergleich der Bildung von 2E-Hexenal aus 13-HPOT bei Mungbohnen- und Luzernekeimlingen. Mittelwerte aus 2 unabhängigen Reaktionsansätzen.

Pflanze	13-HPOT (mmol kg ⁻¹)	2E-Hexenal (mg kg ⁻¹)	Umsatz (%)
Luzerne	0	4,3 ± 0,2	---
	4,11	90,1 ± 2,7	22,3
Mungbohnen	0	33 ± 1,6	---
	4,11	238 ± 7,8	51,2

2.3. Bildung von C₆-Aldehyden und C₆-Alkoholen aus endogenen Fettsäuren in Homogenaten aus Mungbohnenkeimlingen

Die Bildung von C₆-Verbindungen aus endogen in Mungbohnenkeimlingen vorkommenden Fettsäuren durch die Enzyme des Lipoxygenase-Weges ((Phospho-) Lipasen, Lipoxygenasen, Hydroperoxid-Lyasen) wurde über einen Zeitraum von 18 Tagen untersucht. Hierzu wurden die Keimlinge in Intervallen von 2 d geerntet und die daraus hergestellten Homogenate bei unterschiedlichem pH-Wert inkubiert (vgl. 4.6.2.).

Die Keimlinge zeichneten sich vor allem durch die Bildung von **2E-Hexenal** aus (Abb. 2-1). **3Z-Hexenal**, das primäre Produkt der Hydroperoxidspaltung, isomerisierte während der einstündigen Inkubation vollständig zu 2E-Hexenal und konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Mit zunehmendem Keimlingsalter nahm die Konzentration von 2E-Hexenal bei allen untersuchten pH-Werten zu und erreichte nach ca. 14-18 d das jeweilige Maximum. Der für die Inkubation gewählte pH-Wert beeinflusste stark die Bildung von 2E-Hexenal. Ein Höchstwert von 133 mg kg⁻¹ 2E-Hexenal wurde bei pH 4,5 erzielt, wogegen mit zunehmendem pH-Wert die Konzentration von 2E-Hexenal in der Reihenfolge pH 4,5 > 5,5 > 6,5 > 7,5 abnahm.

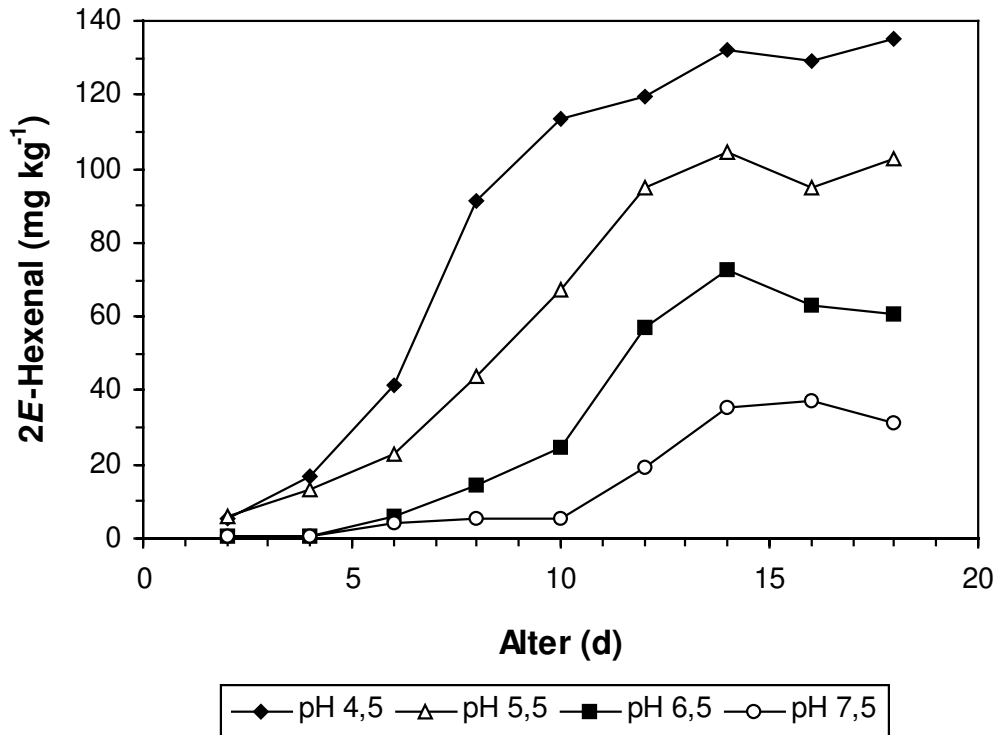


Abb. 2-1: *Bildung von 2E-Hexenal aus endogener Linolensäure in Abhängigkeit vom Keimlingsalter und pH-Wert.*

Weit weniger ausgeprägt war die Bildung des gesättigten Aldehyds **Hexanal** (Abb. 2-2). Lediglich 18 mg kg^{-1} Hexanal wurden als Höchstwert bei pH 4,5 mit 8 d alten Keimlingen erreicht. Eine Erhöhung des pH-Wertes führte zu einer Abnahme der Hexanal-Konzentration in der für 2E-Hexenal bereits beschriebenen Reihenfolge.

Das unter den C_6 -Verbindungen dominierende Produkt 2E-Hexenal wurde teilweise zu **2E-Hexenol** reduziert. Hierbei trat, im Gegensatz zum korrespondierenden Aldehyd, das Bildungsmaximum in der frühen Entwicklungsphase der Keimlinge auf, das je nach gewähltem pH-Wert zwischen 6-10 d lag (Abb. 2-3). Mit 10 d alten Keimlingen wurde bei pH 7,5 ein Höchstwert von 17 mg kg^{-1} 2E-Hexenol erzielt. Das pH-Optimum für die Bildung von 2E-Hexenol lag bei pH 7,5 und unterschied sich somit deutlich von dem des 2E-Hexenals (Abb. 2-4). **Hexanol**, der korrespondierende Alkohol des Hexanals, konnte nur in Spuren nachgewiesen werden.

Auch die hohen Konzentrationen an C_6 -Verbindungen (z. B. 133 mg kg^{-1} 2E-Hexenal), die aus endogenen Fettsäuren gebildet wurden, zeigten, daß in Mungbohnenkeimlingen ein äußerst aktives C_6 -Enzymsystem vorlag. Aufgrund dieser guten Resultate wurden in der vorliegenden Arbeit Mungbohnenkeimlinge als Quelle für die Hydroperoxid-Lyase ausgewählt.

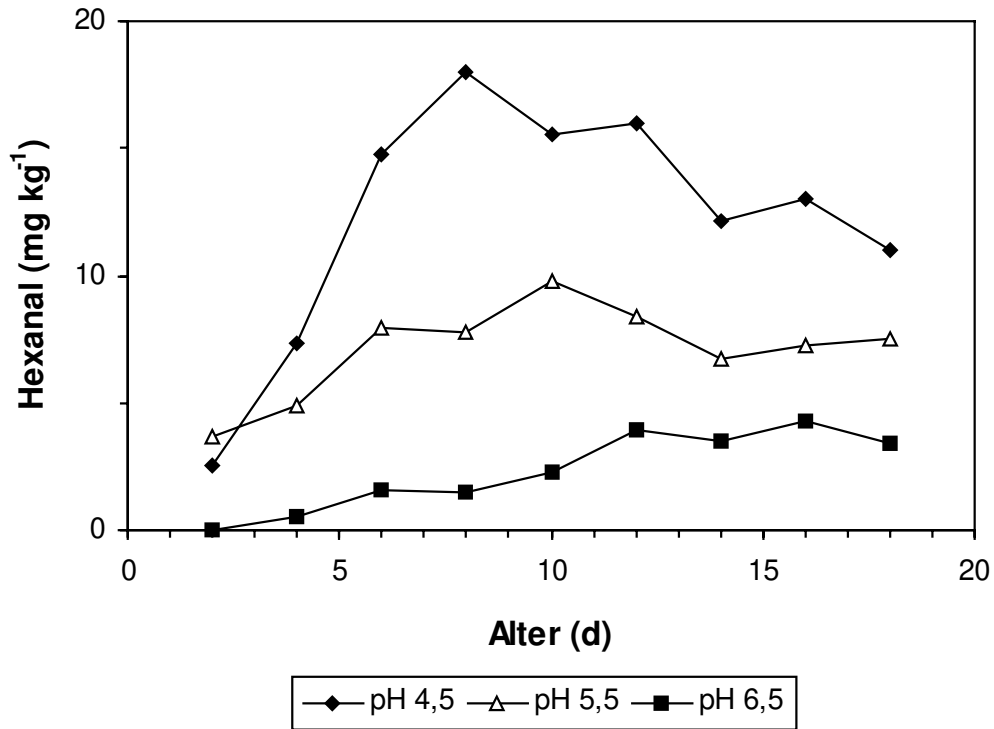


Abb. 2-2: Bildung von Hexanal aus endogener Linolsäure in Abhängigkeit vom Keimlingsalter und pH-Wert.

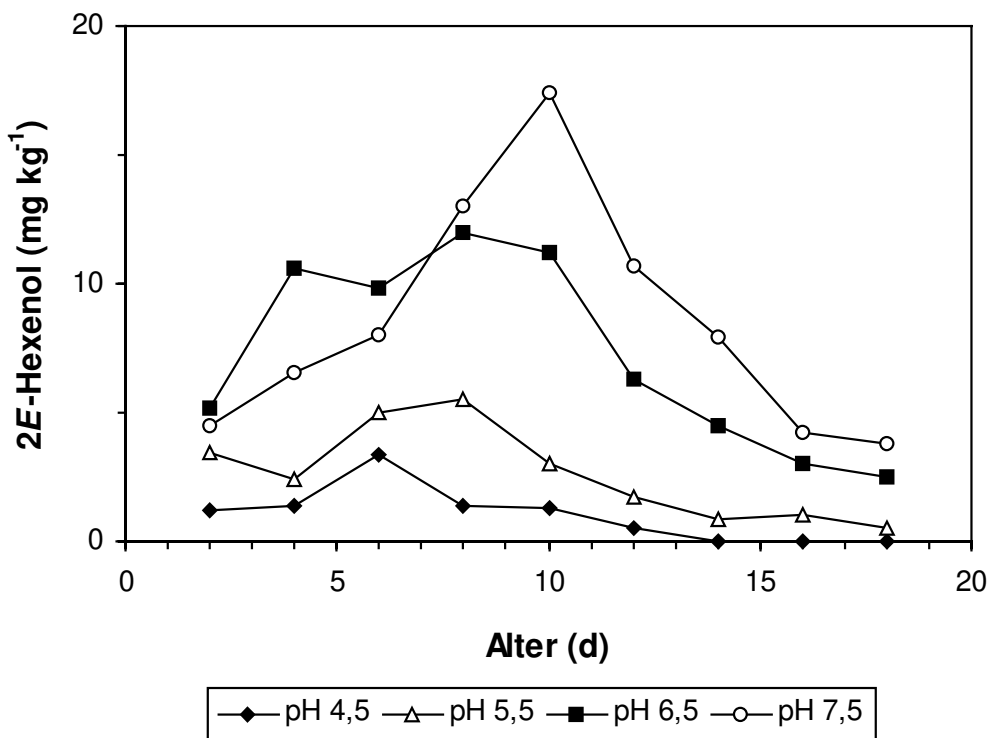


Abb. 2-3: Bildung von 2E-Hexenol aus endogener Linolensäure in Abhängigkeit vom Keimlingsalter und pH-Wert.

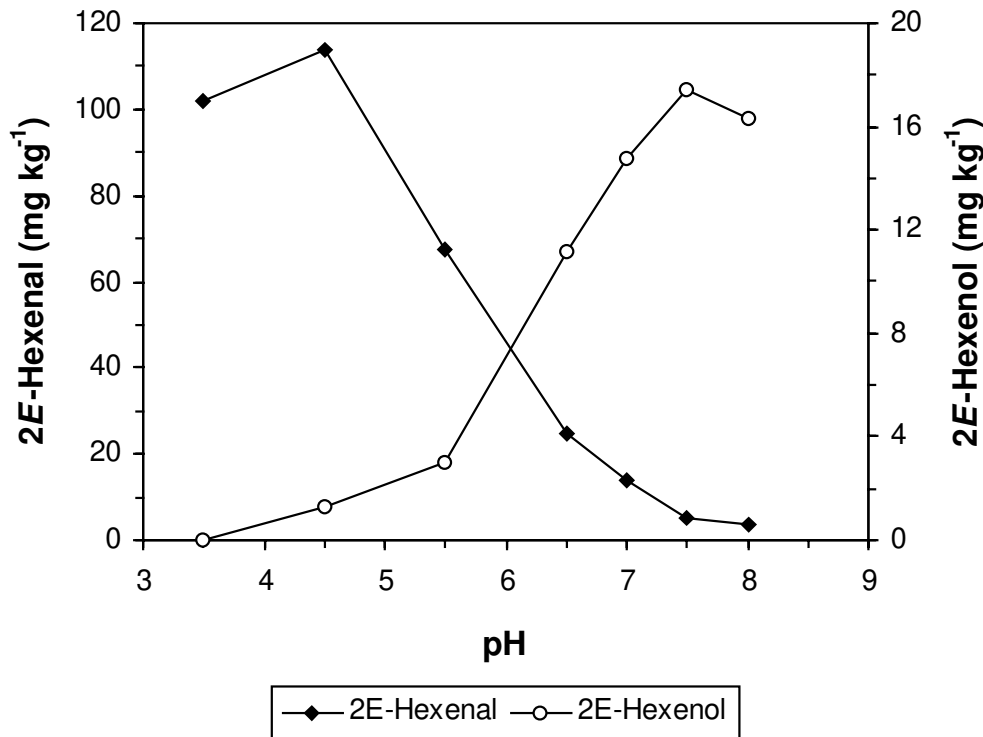


Abb. 2-4: pH-Optima der Bildung von 2E-Hexenal und 2E-Hexenol aus endogener Linolensäure durch 10 d alte Keimlinge.

2.4. Einfluß verschiedener Parameter auf die Bildung von 2E-Hexenal aus 13-HPOT in Homogenaten aus Mungbohnenkeimlingen

2.4.1. Alter der Keimlinge und pH-Wert

Im vorangegangenen Versuch zeigten 14-18 d alte Keimlinge bei pH 4,5 die größte Fähigkeit zur Bildung von 2E-Hexenal aus endogenen Lipiden (vgl. 2.3.). Da jedoch hieran mehrere Enzyme beteiligt waren, repräsentierten die sich dort als günstig erwiesenen Bedingungen nur das Optimum des gesamten Enzymsystems. Verwendete man hingegen 13-HPOT als exogenes Substrat, so war die Bildung des primären Spaltproduktes 3Z-Hexenal nur noch von der Hydroperoxid-Lyase abhängig.

Die Hydroperoxid-Lyase-Aktivität von Mungbohnenkeimlingen wurde über einen Zeitraum von 17 d bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Da die Substratlösung für jeden Versuchstag frisch hergestellt wurde (vgl. 4.4.1.) und die exakte Konzentration von 13-HPOT zum Zeitpunkt der Verwendung noch nicht bekannt war, variierte die jeweils verwendete Substratkonzentration im Bereich von 7,1-8,1 mmol kg⁻¹ 13-HPOT.

Um bei der Beurteilung der Ergebnisse unabhängig von der endogen gebildeten Menge an 2E-Hexenal, die durch entsprechende Blindwerte (Homogenate ohne 13-HPOT) ermittelt wurde, und den etwas unterschiedlichen Substratkonzentrationen zu sein, wurde die molare Umsatzrate berechnet.

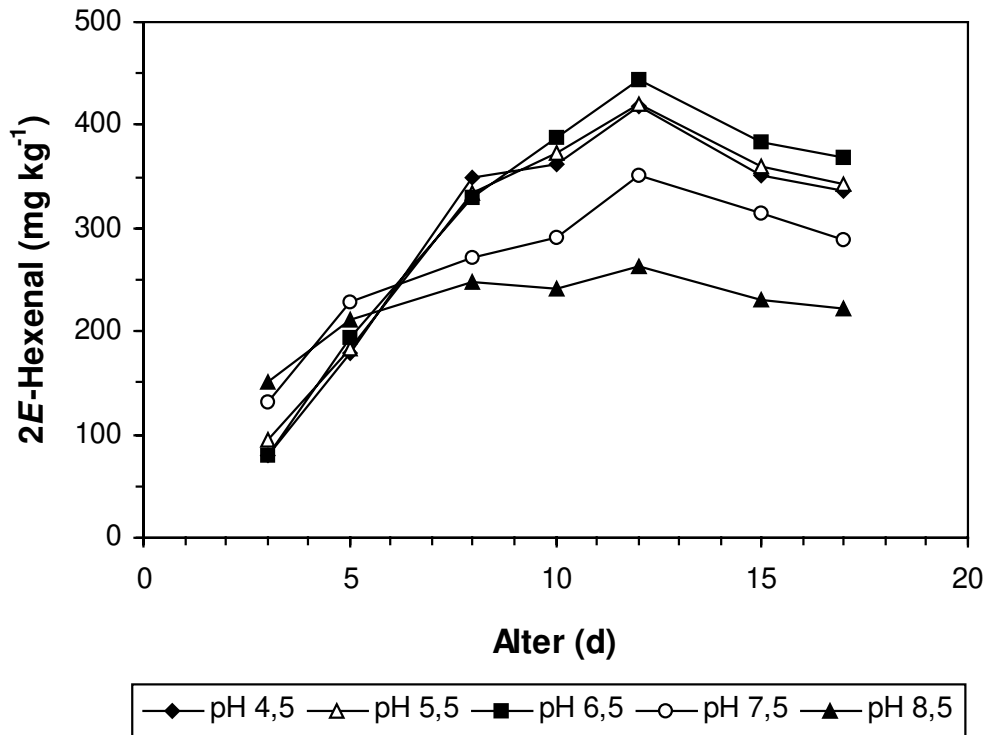


Abb. 2-5: Bildung von 2E-Hexenal nach Zusatz von 13-HPOT (7,1-8,1 mmol kg⁻¹) in Abhängigkeit vom Keimlingsalter und pH-Wert.

Durch Zusatz von 13-HPOT ließ sich im Vergleich zu einer Blindwert-Reihe, die ähnliche Werte wie in 2.3. ergab und daher nicht noch einmal dargestellt wurde, die Konzentration an 2E-Hexenal deutlich steigern (Abb. 2-5). Mit einer Substratkonzentration von 8,1 mmol kg⁻¹ 13-HPOT wurden bei pH 6,5 ein Höchstwert von 443 mg kg⁻¹ 2E-Hexenal und eine Umsatzrate von 49,1 % erhalten (Abb. 2-6). Nach einer anfänglichen Phase relativ geringer Hydroperoxid-Lyase-Aktivität erhöhte sich die Konzentration von 2E-Hexenal bis zum 8. Tag der Keimung bei allen untersuchten pH-Werten sehr stark und erreichte nach 10-12 Tagen ein Maximum. Betrachtete man den Verlauf der Umsatzrate, so war zu erkennen, daß diese in dem Zeitraum von 10-17 Tagen auf annähernd konstantem Niveau blieb bzw. nur leicht abnahm (Abb. 2-6).

Eine erhöhte Bildung von 2E-Hexenol im Vergleich zu der Blindwert-Reihe (maximal 13 mg kg⁻¹) wurde nicht beobachtet.

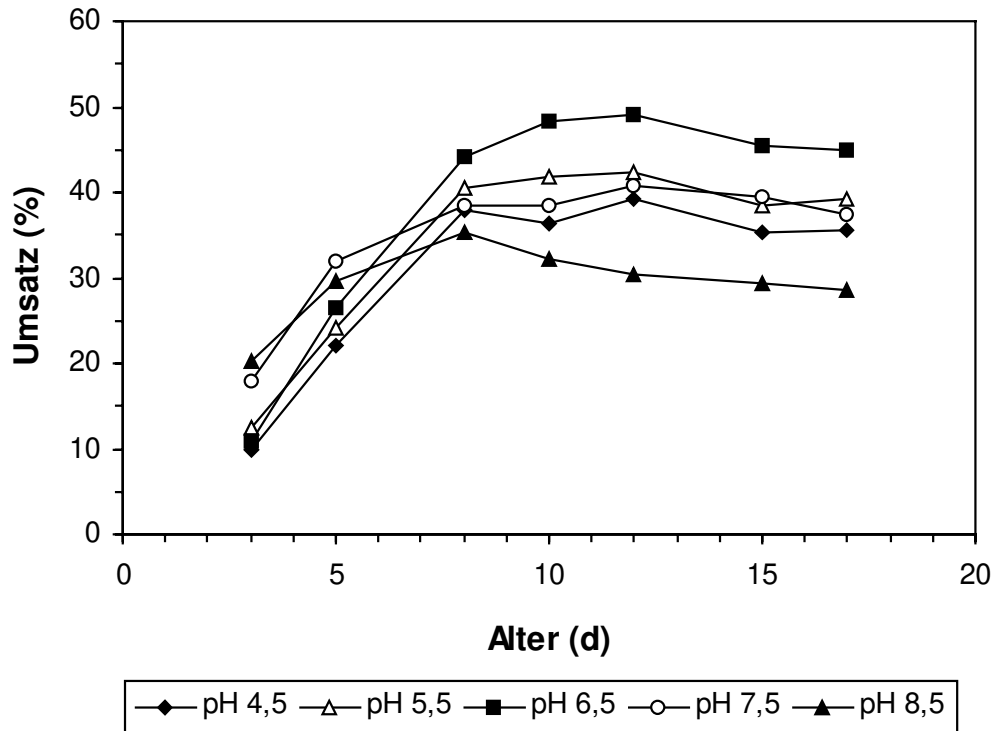


Abb. 2-6: Molare Umsatzrate von 13-HPOT in Abhängigkeit vom Keimlingsalter und pH-Wert.

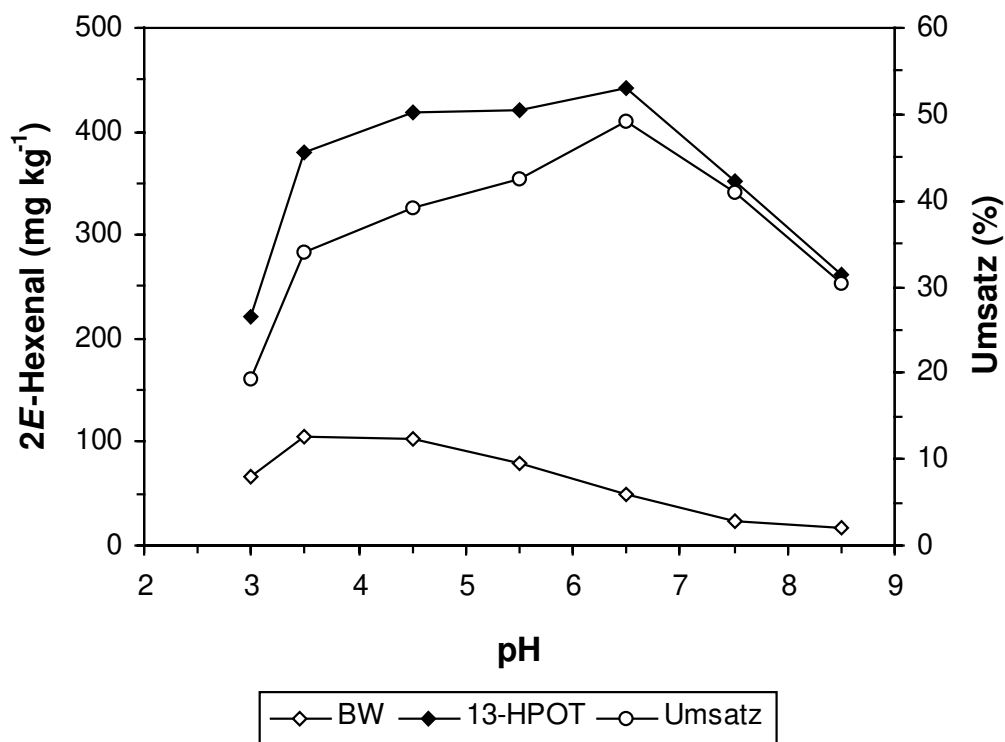


Abb. 2-7: pH-Optimum der Bildung von 2E-Hexenal aus 13-HPOT und endogener Linolensäure. Alter der Keimlinge: 12 d, 13-HPOT: 8,18 mmol kg⁻¹, BW: Blindwert.

Im Gegensatz zum Bildungsoptimum von 2*E*-Hexenal aus endogener Linolensäure, das in etwa bei pH 4,5 lag (vgl. 2.3.), war die Spaltung von 13-HPOT durch die Hydroperoxid-Lyase bei pH 6,5 am effektivsten (Abb. 2-7). Es handelte sich hierbei um einen recht breiten optimalen pH-Bereich, so daß bei pH 5,5 bzw. 7,5 noch 85 % der maximalen Umsatzrate (49,1 %) erzielt wurden. In den folgenden Versuchen wurde die Inkubation mit 13-HPOT mit 10-16 d alten Keimlingen bei pH 6,5 durchgeführt.

2.4.2. Inkubationsdauer

Bislang konnten maximal 49,1 % des Substrates zu 2*E*-Hexenal umgesetzt werden (vgl. 2.4.1.). Eine Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Hydroperoxidspaltung durch die Lyase sollte über mögliche Ursachen Aufschluß geben. Vorstellbar waren z. B. eine nicht ausreichende Inkubationszeit oder im Falle eines frühen Konzentrationsmaximums ein Abbau des 2*E*-Hexenals in enzymatischen oder chemischen Sekundärreaktionen.

Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von Methanol auf eine Endkonzentration in der Lösung von 66 % (v/v) abgestoppt (vgl. 4.6.2.). Vor der Flüssig/Flüssig-Extraktion der Produkte wurde die Methanol-Konzentration auf 20 % (v/v) abgesenkt, um eine effektivere Produktisolierung zu gewährleisten.

Die Geschwindigkeit der 13-HPOT-Spaltung ($C_{13\text{-HPOT}}: 7,74 \text{ mmol kg}^{-1}$) verringerte sich mit zunehmender Inkubationsdauer und kam bei 15 min zum Stillstand (Abb. 2-8). Eine Ausdehnung des Inkubationszeitraumes auf 90 min führte weder zu einer weiteren Erhöhung der Produktkonzentration noch zu einem erkennbaren Abbau des 2*E*-Hexenals. Das primäre Spaltprodukt 3*Z*-Hexenal konnte nur innerhalb der ersten 15 min nachgewiesen werden. Bei länger andauernder Inkubation isomerisierte es vollständig zu 2*E*-Hexenal. Die Umsatzrate betrug 48,9 % und lag damit in der gleichen Größenordnung wie in den bisherigen Versuchen.

Um auch bei höheren Substratkonzentrationen der Hydroperoxid-Lyase eine ausreichende Reaktionszeit zur Verfügung zu stellen, wurde in allen nachfolgenden Experimenten 1 h inkubiert.

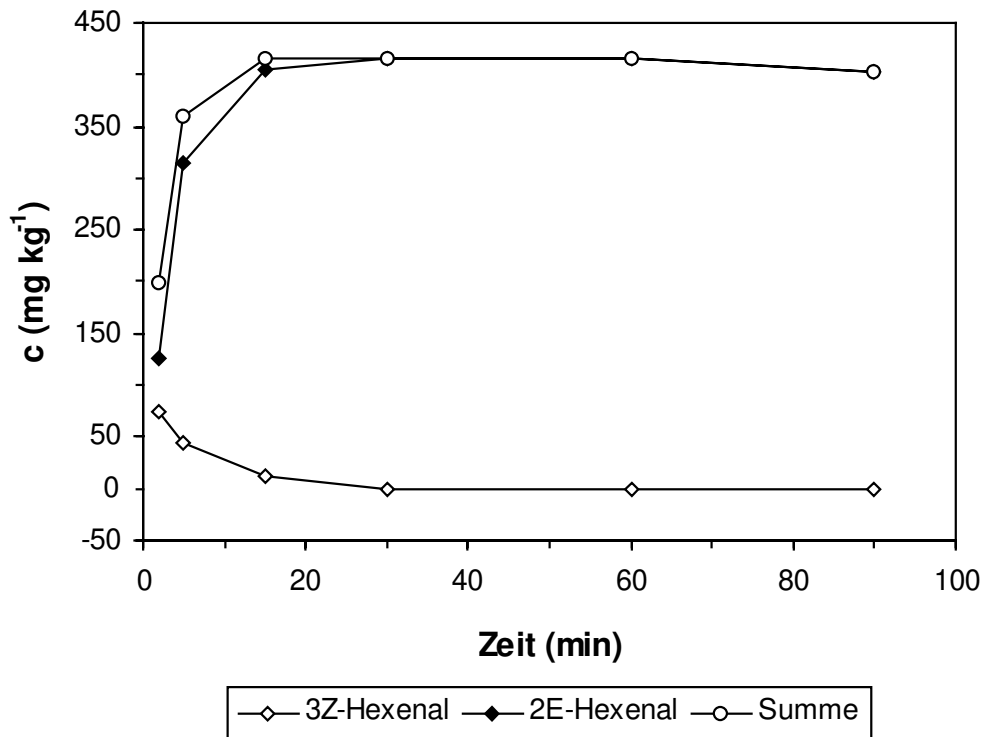


Abb. 2-8: Zeitverlauf der Bildung von 3Z- und 2E-Hexenal.

2.4.3. Konzentration der Keimlinge

Um zu überprüfen, ob die bislang eingesetzte Menge an Keimlingen von 5 g pro 50 mL Reaktionsansatz (100 g L^{-1} , vgl. 4.6.2.) ausreichend war, wurde deren Konzentration im Bereich von $40\text{-}240 \text{ g L}^{-1}$ variiert. In Abweichung zu der bisherigen Angabe der Produktkonzentration in mg kg^{-1} Keimlinge wurden die Werte hier auf das Volumen bezogen, da sich sonst bei konstanter Produktkonzentration pro Ansatz rechnerisch mit zunehmender Keimlingsmenge eine Abnahme der 2E-Hexenal-Konzentration ergeben hätte. Die Inkubation der Homogenate wurde mit $0,79 \text{ mmol L}^{-1}$ 13-HPOT durchgeführt.

Mit zunehmender Keimlingsmenge erhöhte sich die Konzentration an 2E-Hexenal leicht von 41 mg L^{-1} auf 49 mg L^{-1} (Abb. 2-9). Diese Zunahme war jedoch allein auf die größere Menge Pflanzenmaterial im Reaktionsansatz und die damit verbundene Bildung von 2E-Hexenal aus endogener Linolensäure zurückzuführen, da die Steigung dieser Geraden mit der der Blindwert-Reihe identisch war. Die molare Umsatzrate des 13-HPOT wurde hiervon nicht beeinflusst und war mit 48-50 % bei allen Proben nahezu gleich, so daß als Standardbedingung 5 g Keimlinge beibehalten wurden.

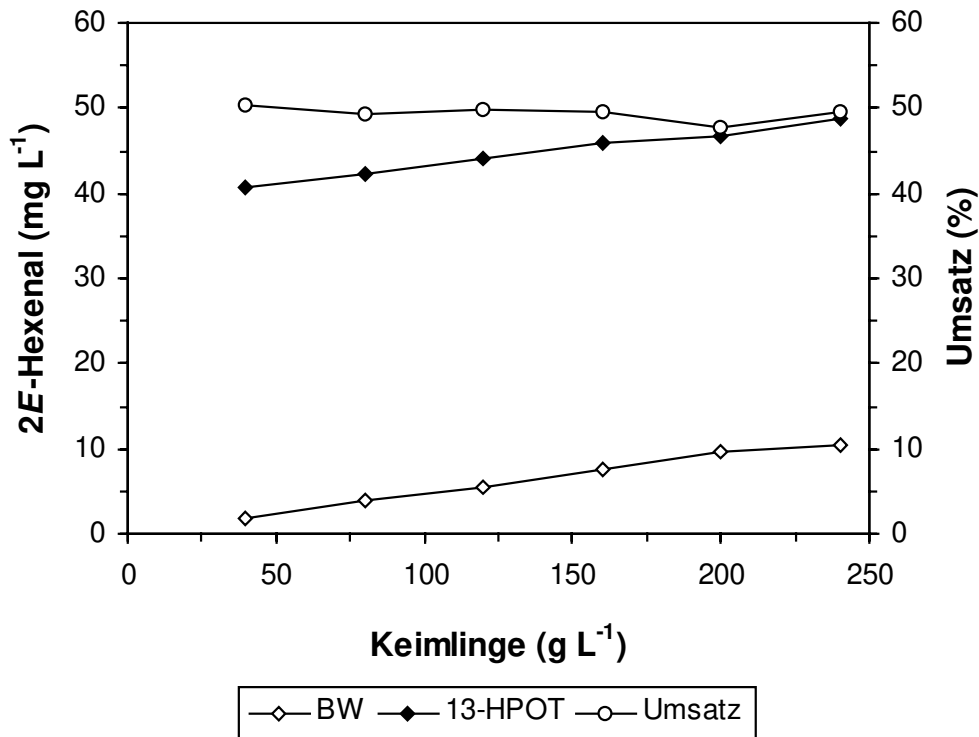


Abb. 2-9: Einfluß der Keimlingskonzentration auf die Bildung von 2E-Hexenal.

2.4.4. Substratkonzentration

Um den Einfluß des Substrates auf die Bildung von 2E-Hexenal zu untersuchen, wurden Homogenate aus 5 g Keimlingen mit 3,3-48,4 mmol kg⁻¹ 13-HPOT inkubiert (vgl. 4.6.2.). Ein entsprechender Blindwert (Homogenat ohne 13-HPOT) wurde bei der Berechnung der Umsatzrate berücksichtigt.

Bis zu einer Konzentration von 32,6 mmol kg⁻¹ 13-HPOT nahm die gebildete Menge an 2E-Hexenal kontinuierlich zu, darüber hinaus war jedoch eine Verminderung der Produktkonzentration feststellbar (Abb. 2-10). Als Höchstwert wurden **1.064 mg kg⁻¹** 2E-Hexenal erzielt, wobei die Umsatzrate 32 % betrug. In dem untersuchten Bereich der Substratkonzentration verringerte sich die Umsatzrate nahezu linear von 46,0 auf 18,6 %. Da im Hinblick auf eine biotechnologische Nutzung der Enzymreaktion nicht nur die absolut gebildete Menge an 2E-Hexenal, sondern auch die Effektivität der 13-HPOT-Spaltung (Molare Umsatzrate) von Interesse war, wurde in den folgenden Experimenten auf sehr hohe Substratkonzentrationen verzichtet.

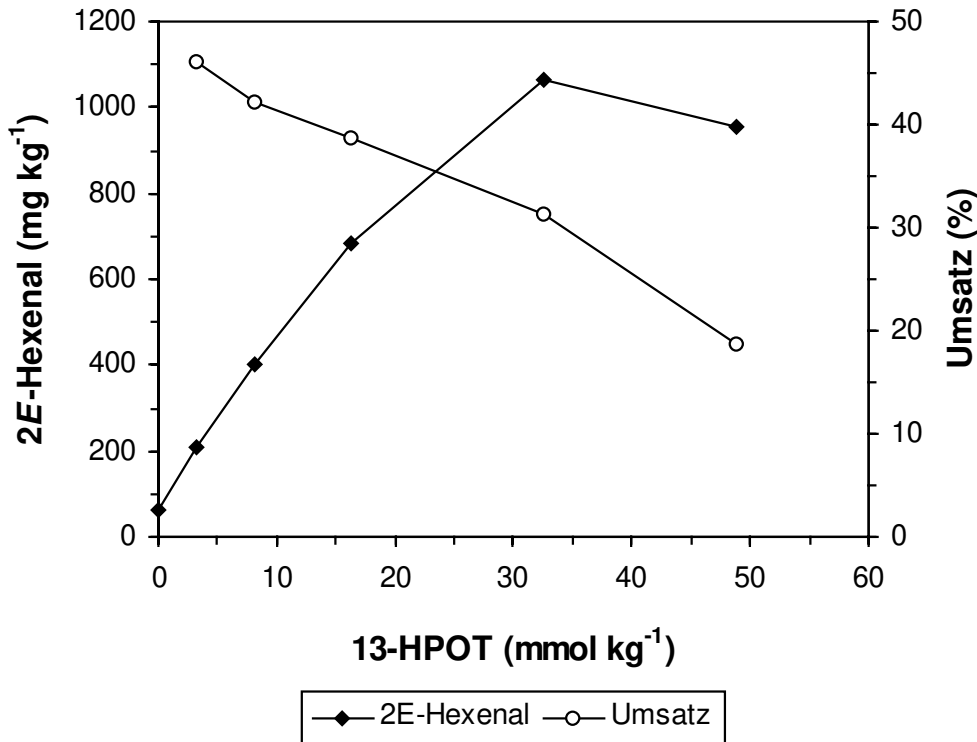


Abb. 2-10: Einfluß der Substratkonzentration auf die Bildung von 2E-Hexenal.

2.4.5. Semikontinuierliche Substratzugabe

Um die Hydroperoxid-Lyase vor einer möglichen Inhibierung durch zu hohe Substratkonzentrationen zu schützen (vgl. 2.4.4.), erfolgte die Zugabe von 13-HPOT in diesem Experiment semikontinuierlich. Während der einstündigen Inkubation wurde in Intervallen von 5 min ein Aliquot der jeweiligen gesamten Substratmenge (6,1-30,5 mmol kg⁻¹) dem Homogenat zugesetzt. Die Bemessung der Aliquots wurde so vorgenommen, daß nach der letzten Zugabe die Inkubation noch 10 min andauerte. Da die Spaltung von 13-HPOT sehr schnell erfolgte (vgl. 2.4.2.), wurde angenommen, daß das Substrat bis zur Zugabe des nächsten Aliquots weitgehend umgesetzt war. Als Vergleich dienten Homogenate, denen 13-HPOT auf einmal (diskontinuierlich) zugegeben wurde. Den zur Berechnung der Umsatzrate erforderlichen Blindwerten wurde anstelle des Substrates das jeweilige Puffervolumen semi- bzw. diskontinuierlich zugesetzt.

Eine semikontinuierliche Substratzugabe bewirkte nur bei den geringen Konzentrationen 6,1 und 10,7 mmol kg⁻¹ eine bessere Umsetzung von 13-HPOT (Abb. 2-11). So konnte im Vergleich zur diskontinuierlichen Zugabe die Umsatzrate um 27 % bzw. 20 % gesteigert werden. Dagegen wurde nach Erhöhung der Konzentration auf 21,4 bzw.

30,5 mmol kg⁻¹ 13-HPOT bei einmaliger Substratzugabe eine größere Umsatzrate erzielt. Auch in diesem Versuch wurde mit **1.070 mg kg⁻¹** eine sehr hohe Konzentration für 2E-Hexenal erhalten, was eine Reproduktion des guten Resultates aus 2.4.4. darstellte.

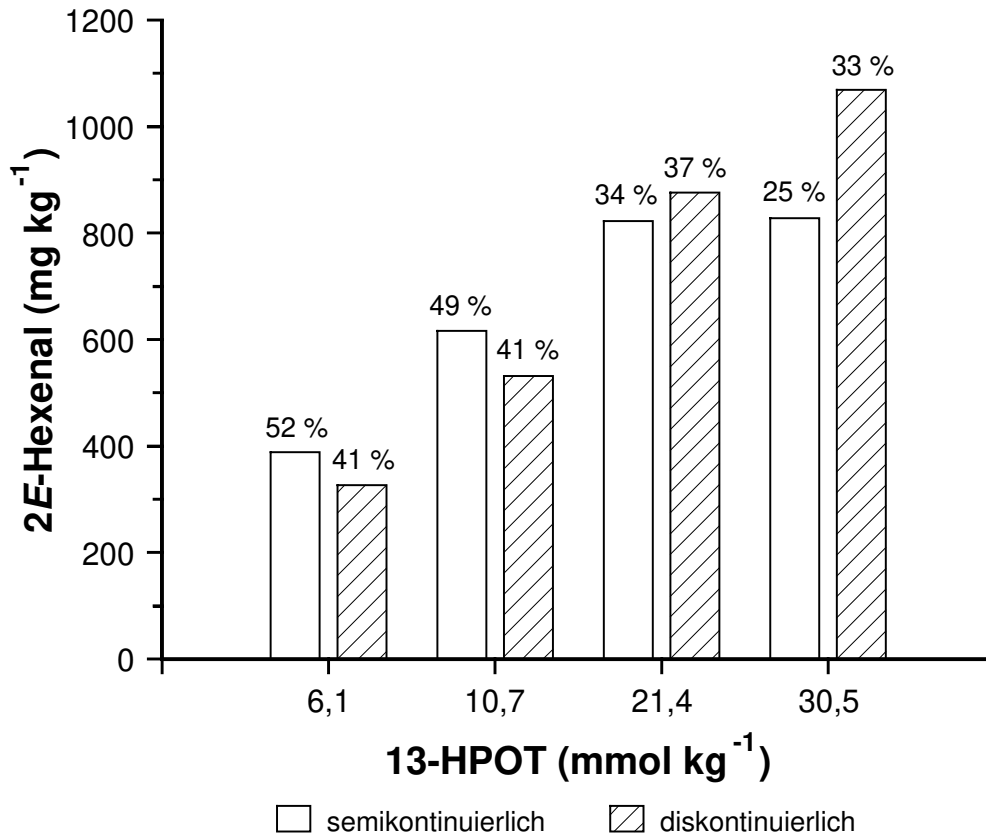


Abb. 2-11: Semikontinuierliche und diskontinuierliche Substratzugabe. 13-HPOT-Konzentration: insgesamt dem Homogenat zugesetzte Substratmenge, Beschriftung der Balken: Umsatzrate.

2.4.6. Überprüfung einer inhibierenden Wirkung von 2E-Hexenal auf die Hydroperoxid-Lyase

Die Aktivität von Enzymen kann u. a. auch durch die jeweils gebildeten Produkte reguliert werden. Im Verlauf der Spaltung von 13-HPOT durch die Hydroperoxid-Lyase tritt zunächst 3Z-Hexenal als primäres Spaltprodukt auf, welches aber nicht im Reaktionsansatz akkumuliert wurde (vgl. 2.4.2.), sondern rasch zum stabileren 2E-Hexenal isomerisierte. Es wurde daher untersucht, ob 2E-Hexenal die Aktivität der Lyase möglicherweise negativ beeinflusste und dies eine Ursache für den unvollständigen Umsatz des Substrates war.

Direkt vor der Substratzugabe wurden einige Homogenate mit 560 mg kg^{-1} *2E*-Hexenal versetzt, was in etwa der Konzentration entsprach, die unter Standardbedingungen bei einer Substratkonzentration von 10 mmol kg^{-1} 13-HPOT (vgl. 4.6.2.) erzielt wurde. Bei den Vergleichsproben wurde dieser *2E*-Hexenal-Zusatz unterlassen. Die Inkubation erfolgte bei zwei unterschiedlichen Substratkonzentrationen, wobei auch zwei Blindwerte (Homogenat ohne 13-HPOT) mitgeführt wurden.

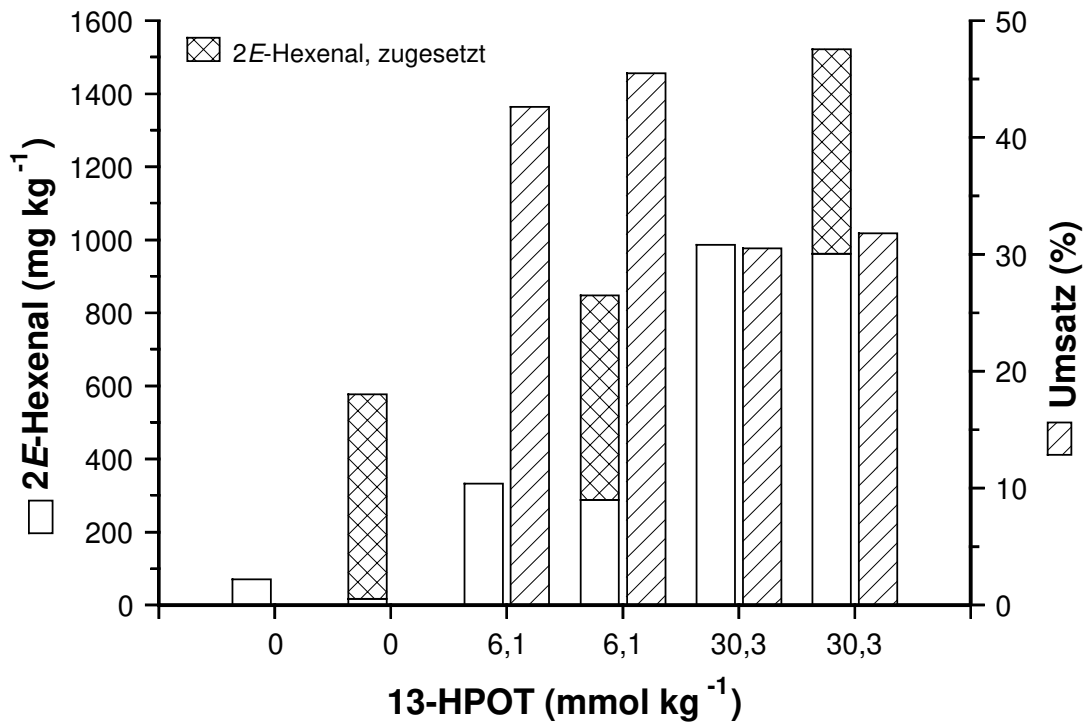


Abb. 2-12: Überprüfung der Enzyminhibierung durch *2E*-Hexenal.

Bei einer Substratkonzentration von $6,1 \text{ mmol kg}^{-1}$ 13-HPOT wurden, unabhängig von einem exogenen Zusatz an *2E*-Hexenal, mit 330 mg kg^{-1} bzw. 290 mg kg^{-1} ähnliche Produktkonzentrationen erhalten (Abb. 2-12). Obwohl die aus dem Substrat gebildete Menge an *2E*-Hexenal in der dotierten Probe etwas geringer war, wurde eine höhere Umsatzrate (45,5 %) errechnet, da in dem mit *2E*-Hexenal versetzten Blindwert die Bildung aus endogener Linolensäure vermindert war. Auch bei höherer Substratkonzentration ($30,3 \text{ mg kg}^{-1}$ 13-HPOT) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der dotierten Probe (961 mg kg^{-1}) und der Vergleichsprobe (986 mg kg^{-1}) festgestellt werden, was sich auch in den Umsatzraten widerspiegelte, die mit 31 % bzw. 32 % fast identisch waren. Eine Inhibierung der Hydroperoxid-Lyase durch *2E*-Hexenal konnte aus diesem Versuch nicht abgeleitet werden.

2.5. Einfluß verschiedener Parameter auf die Bildung von 2E-Hexenal aus 13-HPOT in Rohextrakten aus Mungbohnenkeimlingen

2.5.1. Herstellung eines Rohextraktes mit Hydroperoxid-Lyase-Aktivität

Es sollte nun untersucht werden, ob sich die bislang verwendeten Homogenate durch einen enzymatisch aktiven, partikelfreien Rohextrakt ersetzen ließen, dessen Einsatz in einem Bioprozeß infolge der einfacheren Handhabung vorteilhafter erschien. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse über pflanzliche Hydroperoxid-Lyasen, wurde vermutet, daß es sich bei der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen, wie auch bei anderen Pflanzen beobachtet wurde, um ein membrangebundenes Enzym handelte. Zur Solubilisierung solcher Membranproteine werden häufig Detergenzien verwendet.

Die Keimlinge wurden zum Teil in Gegenwart des nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 (0,1 %, w/v) homogenisiert (vgl. 4.6.3.). Nach einer Solubilisierungszeit von 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler wurden die Homogenate durch Zentrifugation bei 6.400 g in Rohextrakt (E) und Partikel (P) getrennt. Um die Effektivität der Solubilisierung überprüfen zu können, wurden zwei Homogenate (H) (mit/ohne Triton) als Vergleich mitgeführt. Die abgetrennten Pflanzenpartikel wurden in neuem Puffer resuspendiert und ebenso wie die Rohextrakte und Homogenate mit 11,1 mmol kg⁻¹ 13-HPOT inkubiert. Zur Ermittlung des endogen gebildeten 2E-Hexenals wurden entsprechende Blindwerte (Rohextrakt, Partikel, Homogenat ohne 13-HPOT) unter identischen Bedingungen hergestellt und behandelt.

Offensichtlich handelte es sich bei der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen ebenfalls um ein gebundenes Enzym, weil Triton X-100 zur Herstellung eines enzymatisch aktiven Rohextraktes notwendig war (Abb. 2-13). Während in dem Rohextrakt ohne Detergenz eine molare Umsatzrate von nur 10 % erhalten wurde, setzte im Vergleich dazu der mit Triton X-100 gewonnene Rohextrakt 46 % des Substrates zu 2E-Hexenal (543 mg kg⁻¹) um. Hiermit übertraf er die Umsatzrate des ohne Detergenz hergestellten Homogenates von 41 % und blieb nur leicht hinter der Umsatzrate des Homogenates mit Triton von 48 % zurück. Daß in dem mit 0,1 % Triton X-100 hergestellten Homogenat nur 571 mg kg⁻¹ 2E-Hexenal gebildet wurden, während die Summe aus dem entsprechenden Rohextrakt und den sedimentierten Pflanzenpartikeln 811 mg kg⁻¹ 2E-Hexenal betrug, war nur auf den ersten Blick nicht nachvollziehbar. Es mußte jedoch berücksichtigt werden, daß die Substratkonzentration ($2 \times 11,1$ mmol kg⁻¹ 13-HPOT) bei letzteren zusammen doppelt so hoch war wie bei dem Homogenat.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß ein Ersatz der Homogenate durch einen mit Detergenz hergestellten Rohextrakt ohne Einbußen in der Ausbeute an 2E-Hexenal möglich war.

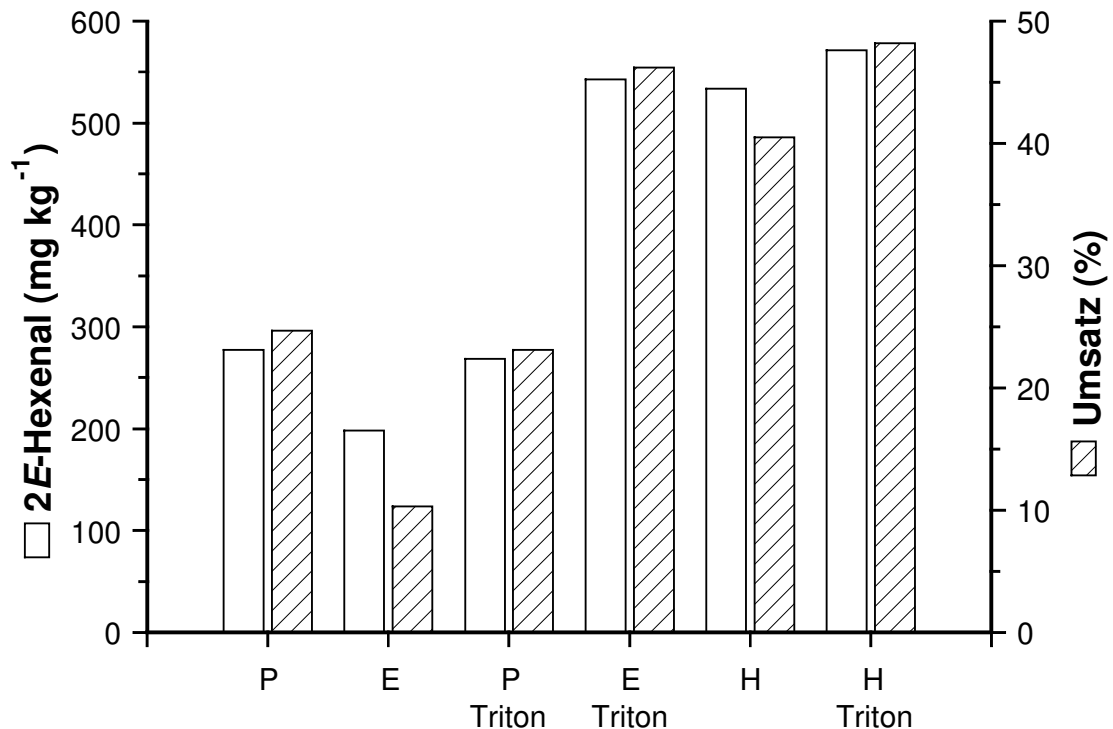


Abb. 2-13: Herstellung eines Rohextraktes mit Hydroperoxid-Lyase-Aktivität.

2.5.2. Dauer der Solubilisierung

In Versuch 2.5.1. wurde die Hydroperoxid-Lyase 30 min bei Raumtemperatur solubiliert (vgl. 4.6.3.). Es sollte nun überprüft werden, ob durch eine Verlängerung der Zeit eine effektivere Freisetzung des Enzyms aus den Zellfragmenten und somit eine höhere Umsetzung von 13-HPOT erreicht werden konnten. Um einen temperaturbedingten Aktivitätsverlust des Enzyms möglichst auszuschließen, wurde die Solubilisierung mit 0,1 % (w/v) Triton X-100 jetzt bei 0 °C durchgeführt. Als Vergleich diente eine Probe, die sofort nach dem Homogenisieren durch Zentrifugation in Partikel und Rohextrakt getrennt wurde (Solubilisierungszeit: 0 min). Das Substrat wurde, mit Ausnahme der Proben, die als Blindwerte dienten, in einer Konzentration von 9,8 mmol kg⁻¹ zugesetzt.

Eine Ausdehnung der Solubilisierungszeit von 30 min auf 60 bzw. 90 min hatte keine vermehrte Bildung von 2E-Hexenal zur Folge, dessen Konzentration bei den drei Proben im Bereich von 547-557 mg kg⁻¹ lag (Abb. 2-14). Bemerkenswert war, daß in dem Rohextrakt, der ohne zusätzliche Solubilisierung gewonnen wurde, fast genauso viel

2E-Hexenal (543 mg kg^{-1}) gebildet wurde. Es mußte jedoch berücksichtigt werden, daß während des Homogenisierens und der 20-minütigen Zentrifugationsphase zumindest ein Teil der Lyase solubilisiert werden konnte. Die molare Umsatzrate betrug bei allen Proben 48-52 %.

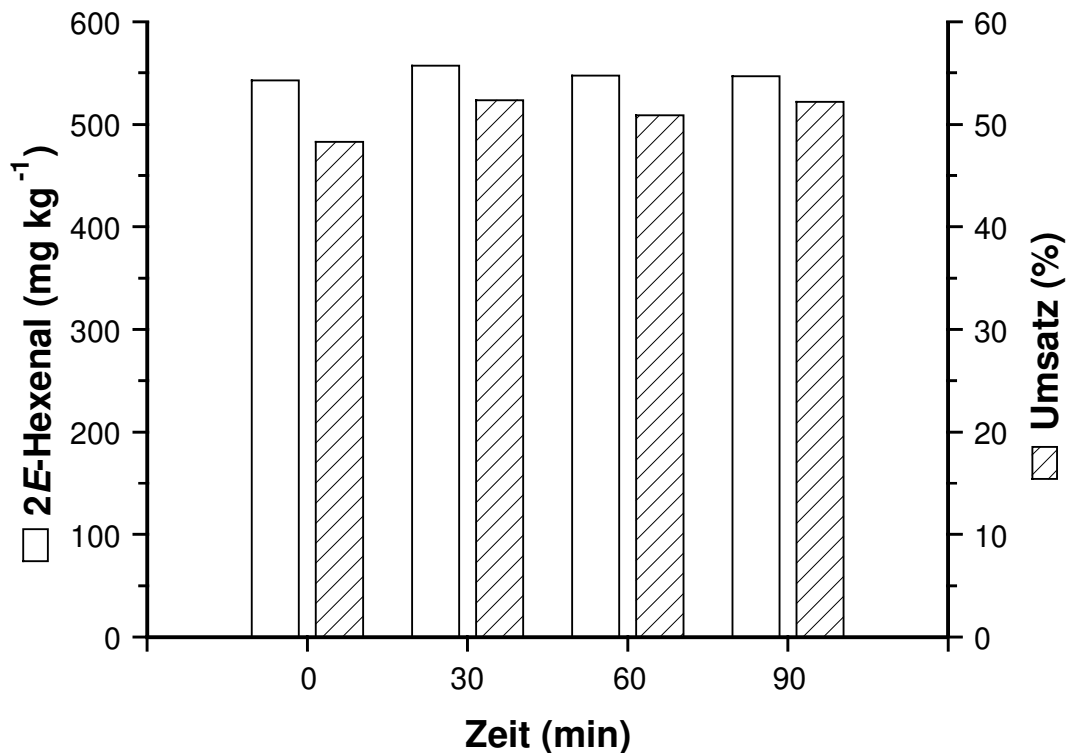


Abb. 2-14: Einfluß der Solubilisierungszeit auf die Bildung von 2E-Hexenal in Rohextrakten.

2.5.3. Detergenzkonzentration

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der Detergenzkonzentration auf die Bildung von 2E-Hexenal wurden Rohextrakte mit einer Konzentration von 0,1, 0,5 und 1,0 % (w/v) Triton X-100 hergestellt und mit $11,1 \text{ mmol kg}^{-1}$ 13-HPOT inkubiert. Als Vergleich diente ein Rohextrakt ohne Detergenz. Das bei oben angeführten Detergenzkonzentrationen aus endogener Linolensäure gebildete 2E-Hexenal wurde bei der Berechnung der Umsatzrate durch entsprechende Blindwerte berücksichtigt. Auf eine Solubilisierungsphase vor der Zentrifugation wurde verzichtet, da offensichtlich die Zeitdauer der gesamten Aufarbeitung ausreichte, einen hinreichend enzymatisch aktiven Rohextrakt zu erhalten (vgl. 2.5.2.).

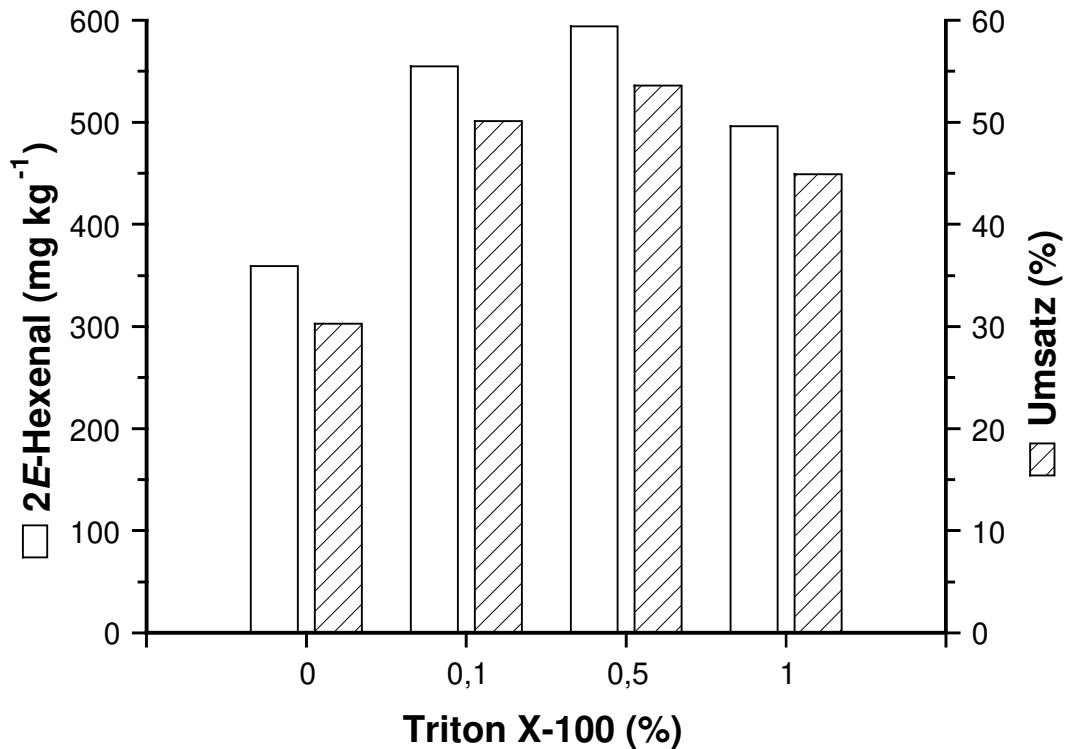


Abb. 2-15: Einfluß der Detergenzkonzentration auf die Bildung von 2E-Hexenal in Rohextrakten.

Die mit Detergenz hergestellten Rohextrakte ergaben, wie auch schon in 2.5.1. beobachtet, allesamt höhere Konzentrationen an 2E-Hexenal als die Vergleichsprobe (Abb. 2-15). Gegenüber dem Rohextrakt mit 0,1 % Triton X-100 ließen sich in der Probe mit 0,5 % Triton X-100 die Produktkonzentration geringfügig von 555 auf 594 mg kg⁻¹ und die Umsatzrate von 50 auf 54 % steigern. Eine weitere Erhöhung auf 1,0 % hatte jedoch eine Abnahme auf 494 mg kg⁻¹ 2E-Hexenal und der Umsatzrate auf 45 % zur Folge. Da mit zunehmender Detergenzkonzentration die Isolierung von 2E-Hexenal mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion erschwert wurde (schlechte Phasentrennung), erwies sich 0,1 % Triton X-100 als guter Kompromiß zwischen Produktbildung und Extraktionsausbeute.

2.5.4. pH-Wert und Inkubationszeit

Eine Überprüfung des pH-Optimums der Hydroperoxid-Lyase in den Rohextrakten bestätigte das mit den Homogenaten erhaltene Resultat (vgl. 2.4.1.). Auch die Spaltung von 13-HPOT erfolgte in den Rohextrakten mit vergleichbarer Geschwindigkeit wie in den Homogenaten (vgl. 2.4.2.).

2.6. Enzymatische Synthese von 13(S)-Hydroperoxy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure (13-HPOT)

Die Bildung von 2E-Hexenal durch die Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen erfordert 13(S)-Hydroperoxy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure (13-HPOT) als Substrat. Da durch Autoxidation von Linolensäure nur ein Gemisch der verschiedenen Hydroperoxid-Isomere erhalten wird, wurde die Peroxidierung von Linolensäure mit der Lipoxygenase-1 aus Soja durchgeführt. Dieses Enzym führt den Sauerstoff regiospezifisch am C₁₃-Atom der Fettsäure ein, sofern die Reaktion bei pH 9,0 und bei 0 °C durchgeführt wird [24]. Im Hinblick auf maximalen Umsatz der Linolensäure und Reinheit des gebildeten Hydroperoxids wurden zunächst in Vorversuchen einige Reaktionsparameter (Konzentration der Fettsäure, Enzymmenge, Begasung mit Sauerstoff) optimiert. Nachfolgend ist nur die Reaktion der Lipoxygenase mit Linolensäure beschrieben (vgl. 4.4.1.), die Umsetzung von Linolensäure zu 13(S)-Hydroperoxy-9Z,11E-octadecadiensäure (13-HPOD) (vgl. 4.4.2.), die später als Substrat in den Aktivitäts-Assays für die Hydroperoxid-Lyase eingesetzt wurde (vgl. 4.8.2.), fand analog statt.

Abb. 2-16 stellt den Reaktionsverlauf der Bildung von 13-HPOT in einem semipräparativen (14 mg Linolensäure) Maßstab dar. Zur Erzielung hoher Umsatzraten mußte insbesondere auf eine feine Dispergierung der Fettsäure im Puffer und eine kontinuierliche Begasung mit Sauerstoff geachtet werden.

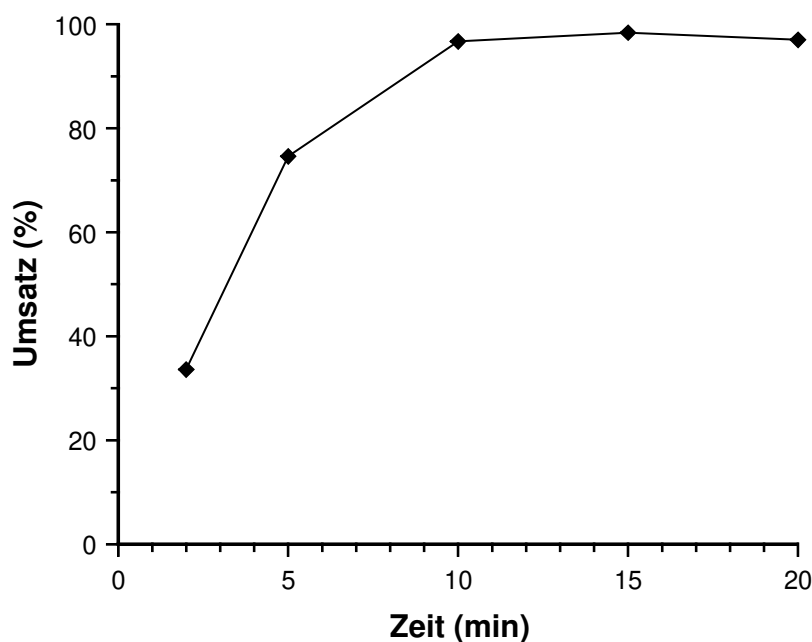


Abb. 2-16: Peroxidierung von Linolensäure (Semipräparativer Maßstab).

Die Peroxidierung, die mit hoher Geschwindigkeit stattfand, konnte sehr leicht photometrisch verfolgt werden. Zu dem gewünschten Zeitpunkt wurde ein Aliquot aus dem Ansatz entnommen und nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion durch Zusatz von Methanol (Enzyminhibierung) die Extinktion bei 235 nm gemessen. Bereits nach 5 min waren ca. 80 % der Linolensäure umgesetzt und nach 10 min war die Reaktion nahezu quantitativ (98 %) abgelaufen. Auch in einem präparativen Maßstab, der mit ca. 120-200 mg Linolensäure durchgeführt wurde, lagen bei entsprechender Anpassung der Enzymkonzentration nach 20 min > 95 % der Linolensäure als Hydroperoxid vor. Aufgrund dieser guten Ausbeuten wurde auf eine Trennung von Hydroperoxid und nicht umgesetzter Fettsäure verzichtet und der gesamte Reaktionsansatz als Substratlösung zur Inkubation der Homogenate und Rohextrakte verwendet (vgl. 2.4., 2.5.).

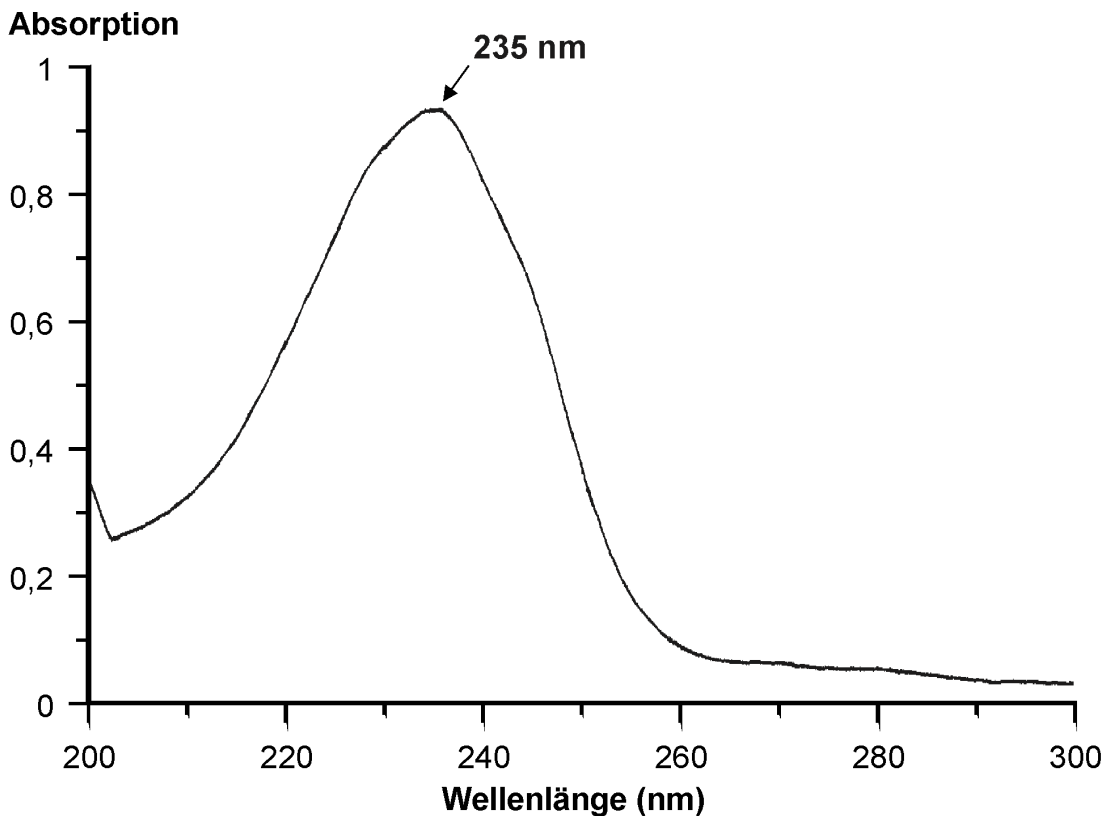


Abb. 2-17: UV-Spektrum von 13-HPOT.

Die UV-spektroskopische Untersuchung des Reaktionsansatzes (präparativer Maßstab) ergab ein Absorptionsmaximum von 235 nm, was auf das konjugierte Dien-System von 13-HPOT zurückzuführen war (Abb. 2-17). Aus dem Fehlen eines Absorptionsmaximums bei 270-280 nm wurde geschlossen, daß die Sauerstoffsättigung während der Umsetzung ausreichend war. Unter (partiell) anaeroben Bedingungen

hätten Verbindungen mit Ketodien-Struktur gebildet werden können, die in diesem Wellenlängenbereich absorbieren [1, 26].

Die Reinheit von 13-HPOT wurde nach Festphasenextraktion mit der HPLC überprüft (vgl. 4.2.1., 4.4.1.). Im Chromatogramm waren nur zwei Peaks erkennbar, von denen der letzte einen Anteil an der gesamten Peakfläche von ca. 95 % besaß (Abb. 2-18). Durch Reduktion mit Natriumborhydrid verringerte sich die Fläche des zweiten Peaks (21,5 min), während die Fläche des ersten Peaks (15,0 min) in dem gleichen Ausmaß größer wurde. Es wurde daher angenommen, daß es sich bei dem ersten Peak um 13-Hydroxy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure (13-HOT) und bei dem zweiten um 13-Hydroperoxy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure (13-HPOT) handelte.

Rel. Intensität (%)

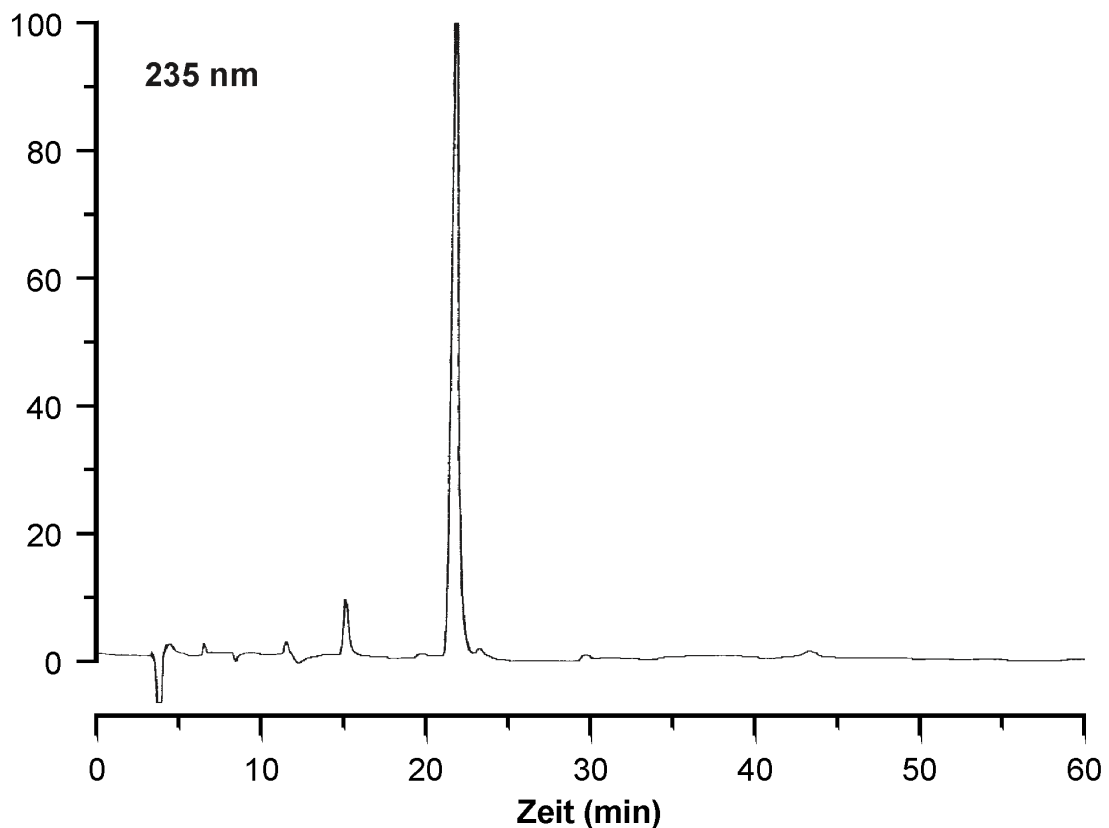


Abb. 2-18: Überprüfung der Reinheit von 13-HPOT mittels HPLC. HPLC-System 1.

2.7. Bildung von 2E-Hexenal und Hexanal in einem mehrstufigen enzymatischen Verfahren aus Leinöl

Im Hinblick auf eine industrielle Anwendung der Enzyme des Lipoxygenase-Weges zur Produktion grüner Aromenoten war der Ersatz von reiner Linolensäure durch einen preisgünstigeren Rohstoff wünschenswert. Eine hervorragende Alternative stellen Pflanzenöle dar, die sich durch einen hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren auszeichnen. Es wurde daher untersucht, ob sich Leinöl als Ausgangsmaterial in diesem enzymatischen Verfahren eignete.

Das Verfahren umfaßte insgesamt vier Enzymreaktionen, von denen die beiden letzten Reaktionen, die Spaltung der Hydroperoxide und die Isomerisierung des primären Spaltproduktes 3Z-Hexenal, gleichzeitig abliefen (Abb. 2-19). Nach enzymatischer Hydrolyse des Öl mit einer Lipase, erfolgte in dem Hydrolysat nach Zusatz der Lipoxygenase die Peroxidierung von Linol- und Linolensäure. Anschließend wurden die resultierenden Hydroperoxide durch die Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnenkeimlingen gespalten. Es wurde hierbei so vorgegangen, daß nach Ablauf der jeweiligen Einzelreaktion der gesamte Reaktionsansatz als Substratlösung für die folgende Reaktion eingesetzt wurde, ohne die Enzyme abzutrennen oder die Produkte zu isolieren.

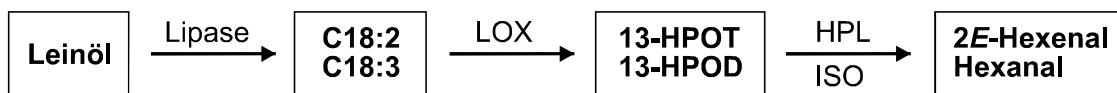


Abb. 2-19: Verwendung von Leinöl zur Gewinnung von Grünnoten. LOX: Lipoxygenase, HPL: Hydroperoxid-Lyase, ISO: Isomerase.

2.7.1. Charakterisierung von Leinöl

Um die Umsatzraten der einzelnen enzymatischen Reaktionen berechnen zu können, war zunächst eine Charakterisierung des verwendeten Leinöls erforderlich. Daher wurden sowohl die Fettsäure-Verteilung analysiert (vgl. 4.5.1.1.) als auch die Verseifungszahl bestimmt (vgl. 4.5.1.2.).

Der Anteil von Linol- und Linolensäure an den gesamten Fettsäuren war mit 18,9 bzw. 49,3 % recht hoch (Tab. 2-2). Die Konzentration von Linolsäure in dem Öl betrug 148 mg g⁻¹ und von Linolensäure 385 mg g⁻¹ (Mittelwerte aus 4 Bestimmungen).

Tab. 2-2: Fettsäure-Verteilung von Leinöl.

Fettsäure	Anteil (Flächen-%, GC)
Palmitinsäure (C16:0)	5,6
Stearinsäure (C18:0)	4,5
Ölsäure (C18:1)	20,5
trans-Ölsäure ?	0,8
Linolsäure (C18:2)	18,9
Linolensäure (C18:3)	49,3
Arachinsäure (C20:0)	0,2
Behensäure (C22:0)	0,2

Die Verseifungszahl ist ein Maß für die in Fetten vorkommenden gebundenen und freien Säuren und steht in direktem Zusammenhang mit deren mittlerer molaren Masse: Je größer die mittlere molare Masse der enthaltenen Fettsäuren, desto kleiner ist die Verseifungszahl. Sie ist als die Menge Kaliumhydroxid (in mg) definiert, die zur Verseifung von 1 g Fett erforderlich ist.

Die Verseifungszahl des untersuchten Leinöls betrug 192 (Mittelwert aus 4 Bestimmungen), was einer Konzentration von 3,43 mmol Fettsäuren pro 1 g Öl entsprach. Diese Stoffmenge repräsentierte den Wert, der bei vollständiger Hydrolyse erreicht werden konnte, und wurde zur Berechnung des Ausmaßes der enzymatischen Hydrolyse 100 % gleichgesetzt.

2.7.2. Enzymatische Hydrolyse von Leinöl - Optimierung einiger Reaktionsparameter

Leinöl wurde mit einer Lipase aus *Candida rugosa* (früher: *C. cylindracea*) enzymatisch hydrolysiert (vgl. 4.5.2.). Zur Ermittlung des pH-Optimums wurden 250 mg Leinöl bei unterschiedlichen pH-Werten 1,5 h inkubiert. Die höchsten Umsatzraten (ca. 90-92 %) wurden im Bereich von pH 7,0 bis 7,5 erhalten (Abb. 2-20). In den folgenden Experimenten wurde die Hydrolyse bei pH 7,5 durchgeführt.

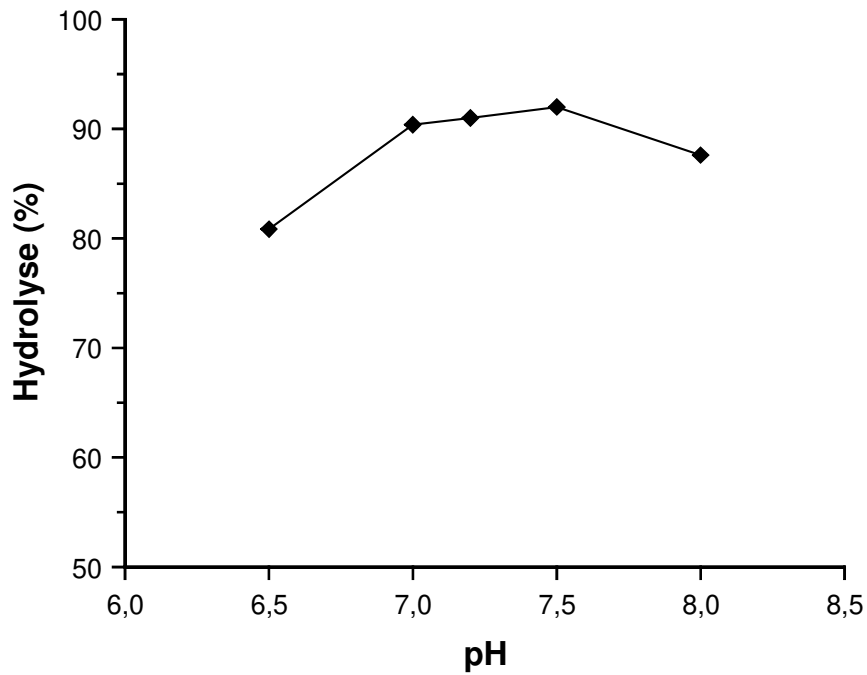


Abb. 2-20: Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse von dem pH-Wert.
Reaktionsbedingungen: Leinöl: 250 mg, T: 25 °C, t: 1,5 h.

Abb. 2-21 zeigt den Einfluß der Inkubationszeit auf die Geschwindigkeit der Fetthydrolyse. Bereits nach 1,5 h waren 92 % des Öls hydrolysiert. Eine Verlängerung der Inkubationszeit hatte nur noch eine geringfügige Erhöhung der Hydrolyserate zur Folge.

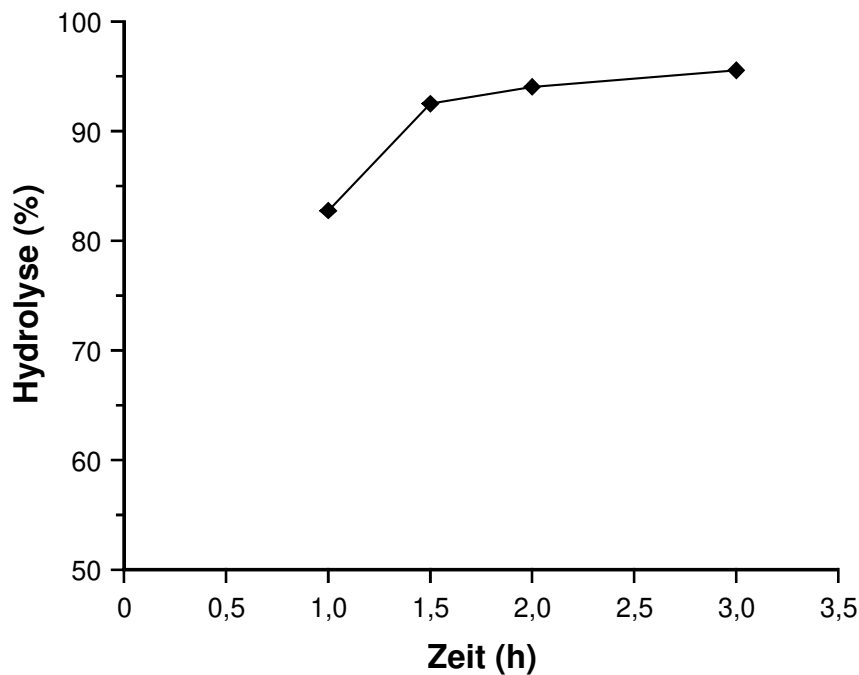


Abb. 2-21: Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse von der Inkubationszeit.
Reaktionsbedingungen: Leinöl: 250 mg, T: 25 °C, pH: 7,5.

2.7.3. Kombination der enzymatischen Einzelreaktionen

1 g Leinöl wurde enzymatisch hydrolysiert (vgl. 4.5.2.), peroxidiert (vgl. 4.4.1.) und anschließend als Substratlösung für die Hydroperoxid-Lyase eingesetzt (vgl. 4.6.3.). Die für die Peroxidierung von Linolensäure ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen waren auf hydrolysiertes Leinöl direkt übertragbar. Da sowohl Linol- als auch Linolensäure in dem Hydrolysat als Substrat für die Lipoxygenase dienten, konnten bei der photometrischen Bestimmung die gebildeten Hydroperoxide (13-HPOT, 13-HPOD) nur als Summe erfaßt werden. Die Umsatzraten der Hydrolyse und der Peroxidierung lagen bei 90 % bzw. 95 %.

Um zu überprüfen, ob bei der Hydrolyse des Öls oder bei der Peroxidierung eine dieser beiden Fettsäuren durch die beteiligten Enzyme bevorzugt wurde, wurde das Verhältnis der beiden Hydroperoxide mit der HPLC bestimmt (vgl. 4.2.1.) und mit dem Quotienten aus den gaschromatographisch ermittelten Konzentrationen der Fettsäuren (Linolensäure, C18:3: 385 mg g⁻¹, Linolsäure: C18:2: 148 mg g⁻¹, vgl. 2.7.1.) verglichen (vgl. 4.5.1.1.). Das Verhältnis der HPLC-Peakflächen der Hydroperoxide stimmte im Rahmen der Meßgenauigkeit gut mit den GC-Ergebnissen überein, was darauf hindeutet, daß keine Diskriminierung zwischen den beiden Fettsäuren eintrat.

HPLC:	13-HPOT : 13-HPOD	2,44 : 1
GC:	C18:3 : C18:2	2,60 : 1

Unterschiedliche Volumina (5, 10, 15, 20, 25 mL) dieser Substratlösung ($c_{\text{Leinöl}}$: 10 g L⁻¹, $c_{13\text{-HPOT}}$: 12,0 mM, $c_{13\text{-HPOD}}$: 4,62 mM) wurden Rohextrakten aus 5 g Mungbohnenkeimlingen zugesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 1 h wurden die Produkte extrahiert (vgl. 4.6.3.) und gaschromatographisch analysiert (vgl. 4.2.2.).

Bis zu einer Konzentration des Leinöls von 30 g kg⁻¹ Keimlinge (36 mmol kg⁻¹ 13-HPOT) nahm die Bildung von **2E-Hexenal** zu und erreichte mit **797 mg kg⁻¹** ein Maximum (Abb. 2-22). Eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration ergab jedoch eine leicht abnehmende Tendenz der Produktmenge. Die Umsatzrate verminderte sich in dem untersuchten Konzentrationsbereich kontinuierlich von 38,7 % auf 11,2 %.

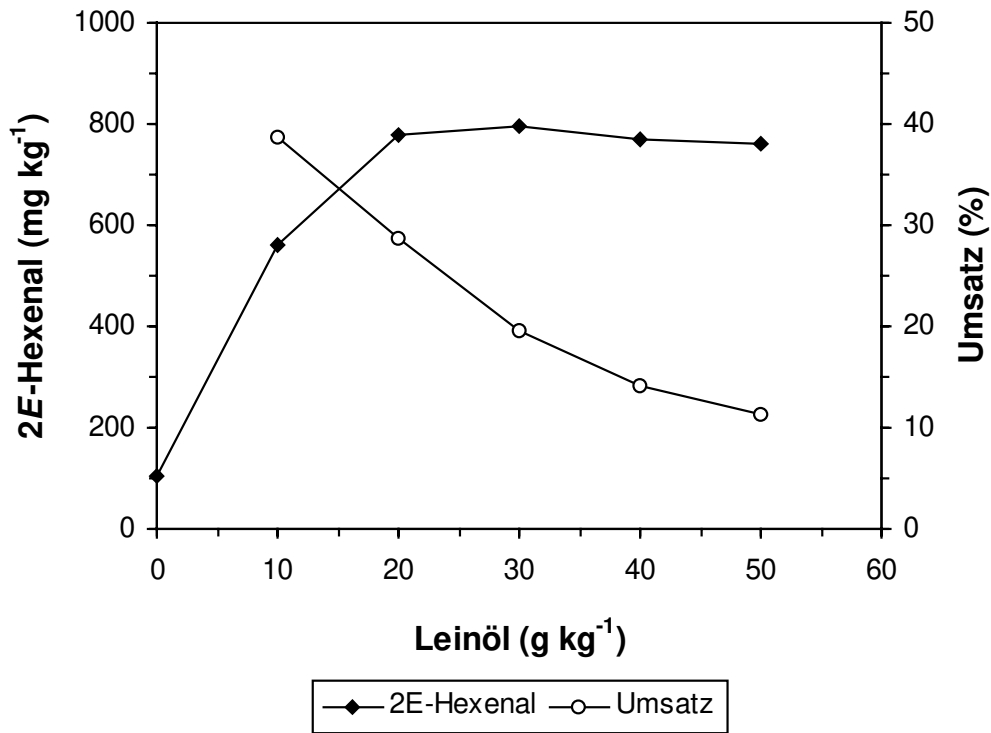


Abb. 2-22: Bildung von 2E-Hexenal aus hydrolysiertem und peroxidiertem Leinöl.

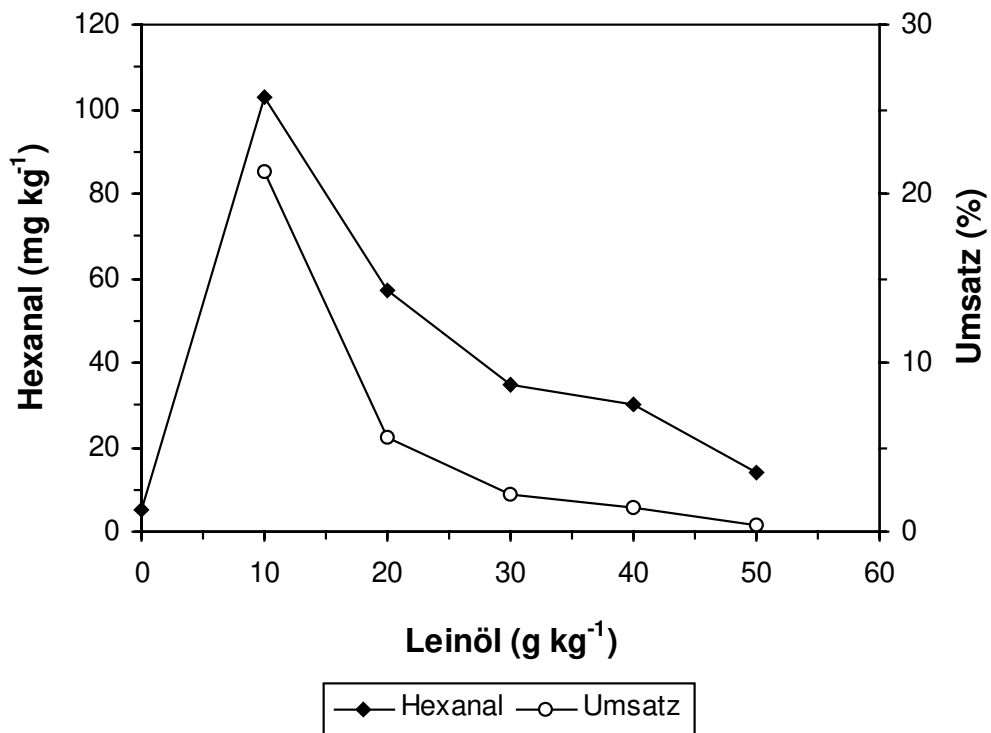


Abb. 2-23: Bildung von Hexanal aus hydrolysiertem und peroxidiertem Leinöl.

Da die Konzentration von 13-HPOD in der Substratlösung im Vergleich zu 13-HPOT geringer war, wurde dementsprechend auch weniger Hexanal gebildet (Abb. 2-23). Ein Höchstwert von **103 mg kg⁻¹ Hexanal** wurde bei einer Substratkonzentration von 10 g kg⁻¹ Leinöl (4,62 mmol kg⁻¹ 13-HPOD) erreicht. Die Umsatzraten waren mit 21,3-0,4 % wesentlich niedriger als bei der Spaltung von 13-HPOT. Offensichtlich stellte 13-HPOT im Vergleich zu 13-HPOD das von der Hydroperoxid-Lyase bevorzugte Substrat dar. Dies konnte daran abgelesen werden, daß das Verhältnis der Umsatzraten beider Hydroperoxide bei den unterschiedlichen Substratkonzentrationen nicht konstant blieb. So betrug es bei 10 g kg⁻¹ Leinöl 1,8 (13-HPOT : 13-HPOD), bei 30 g kg⁻¹ 8,9 und bei 50 g kg⁻¹ sogar 28.

2.8. Partielle Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen

Da sich möglicherweise in dem bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Rohextrakt außer der Hydroperoxid-Lyase noch weitere Enzyme befanden, die ebenfalls 13-HPOT metabolisierten und eventuell zu der Bildung von Nebenprodukte führten, sollte die Hydroperoxid-Lyase aufgereinigt werden. Anschließend war deren Immobilisierung und Einsatz zur Gewinnung von 2*E*-Hexenal beabsichtigt.

Eine Übersicht über die Durchführung der Aufarbeitung ist in Abb. 2-24 dargestellt. Sie umfaßte die Herstellung eines Rohextraktes, Gewinnung einer Membranfraktion durch Zentrifugation bei 30.000 *g* und Solubilisierung der Lyase aus den Membranpartikeln durch ein Detergenz (vgl. 4.6.4.).

Die bisherige Vorgehensweise zur Herstellung eines Rohextraktes (Homogenisierung der Keimlinge in Gegenwart eines Detergenz, vgl. 4.6.3.) eignete sich nicht für eine Enzymaufreinigung, da hierfür eine relativ große Menge an Puffer benötigt wurde und somit die Proteinkonzentration in dem Extrakt sehr gering war. Vorteile der Solubilisierung der Membranfragmente waren neben einer Reduzierung des notwendigen Puffer Volumens eine Abtrennung von löslichen Proteinen und anderen möglicherweise störenden Pflanzeninhaltsstoffen, die mit dem ersten Zentrifugationsüberstand verworfen wurden. Triton X-100 wurde durch die reduzierte Form (Triton X-100R) ersetzt, damit es während der Chromatographie bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm nicht zu Interferenzen kam.

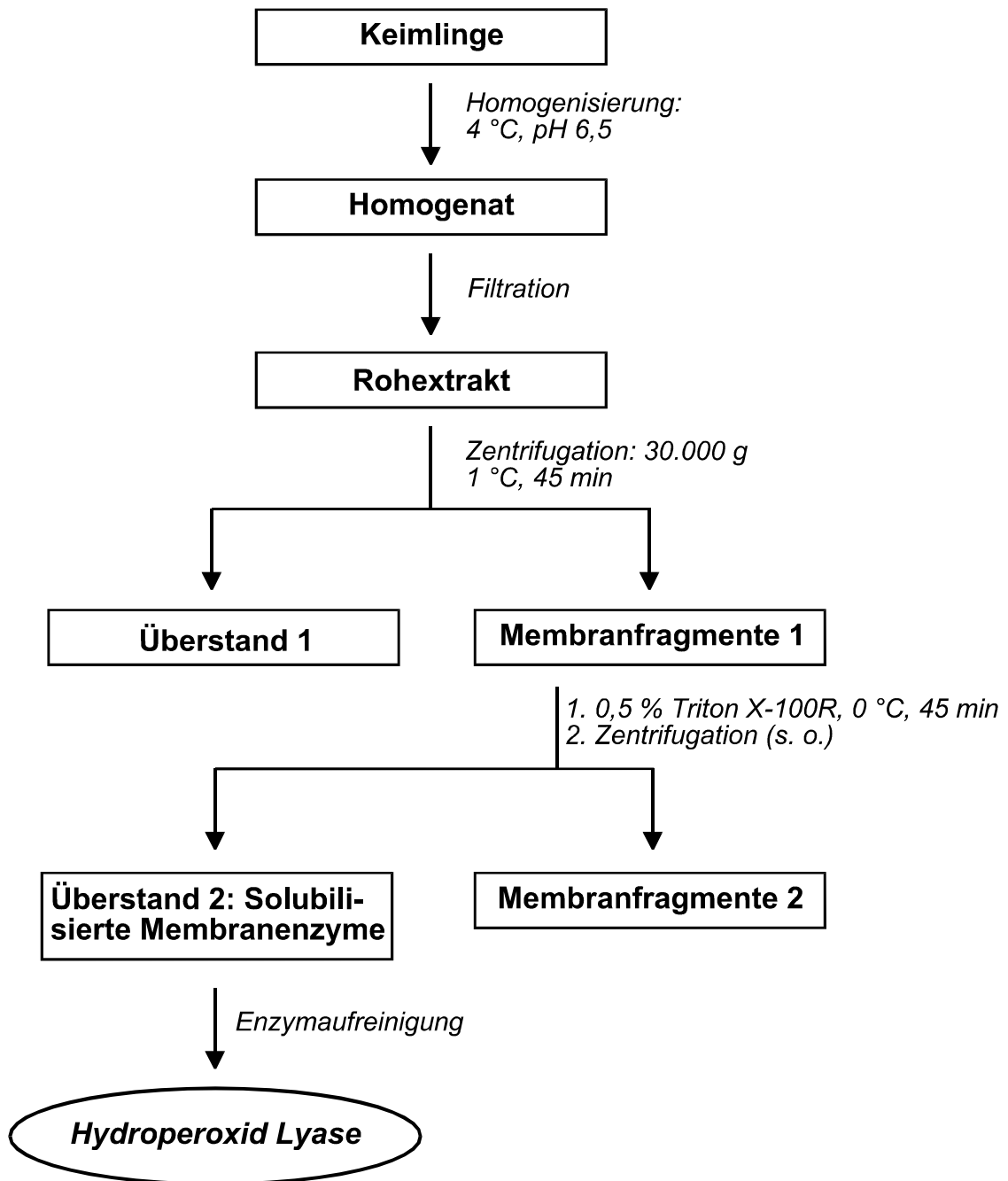


Abb. 2-24: Schema der Aufarbeitung.

Abb. 2-25 zeigt die Verteilung von Protein und Hydroperoxid-Lyase-Aktivität einer repräsentativen Aufarbeitung. Der aus der Aufarbeitung (vgl. 4.6.4.) von 100 g Keimlingen resultierende Rohextrakt enthielt 1.011 mg Protein und 82,1 U Lyase. Die Sedimentation der Membranfragmente bei 30.000 g war nahezu vollständig, da der Überstand der Zentrifugation nur noch 5,9 U (7,2 %) enthielt. Im Gegensatz dazu erfolgte die Solubilisierung der Lyase aus den Membranfragmenten mit einer wesentlich schlechteren Ausbeute: Nur 35 % der Anfangsaktivität (28,7 U) konnten in dem Solubi-

lisat nachgewiesen werden. Aufgrund der im Vergleich zu dem Rohextrakt drastisch verringerten Proteinmenge (9,6 % des anfänglichen Proteins) wurde bei einer Enzymaktivität von 28,7 U für das Solubilisat eine höhere spezifische Aktivität berechnet. Somit wurde in dem vorliegenden Beispiel bereits bei der Solubilisierung ein Aufreinigungsfaktor (Quotient der spezifischen Aktivitäten) von 3,6 erzielt.

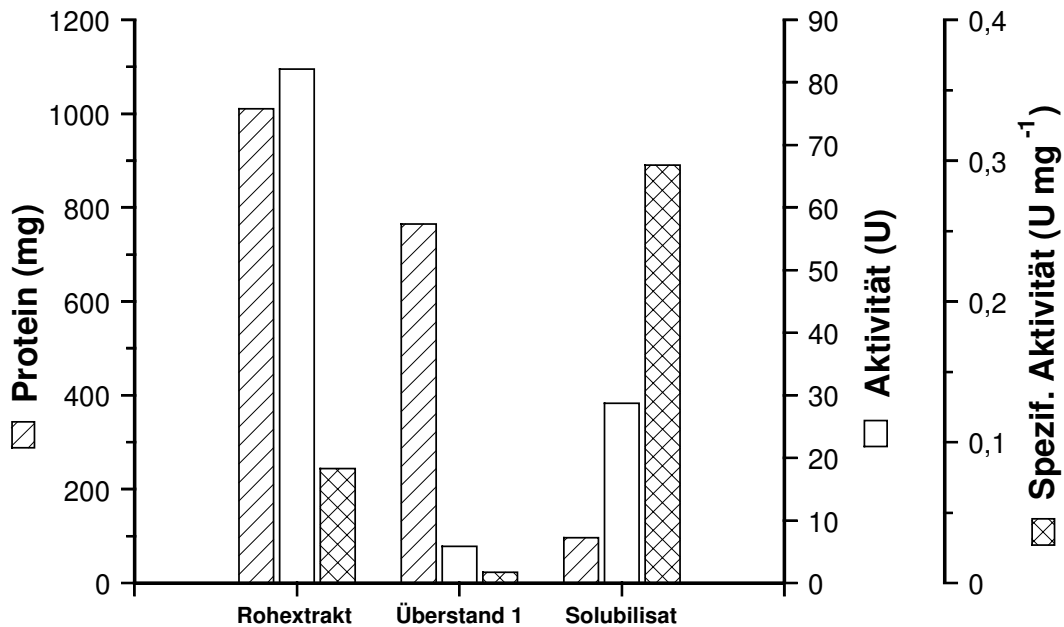


Abb. 2-25: Verteilung von Protein und Hydroperoxid-Lyase-Aktivität bei der Aufarbeitung.

2.8.1. Versuche zur Verbesserung der Solubilisierungseffizienz

Im Durchschnitt erfolgte die Solubilisierung der Hydroperoxid-Lyase in einem Ausmaß von 35-40 %. Durch Variation der Detergenzkonzentration und der Zeit sollte versucht werden, die Effizienz der Solubilisierung zu erhöhen. Es wurden jeweils 50 g Keimlinge aufgearbeitet (vgl. 4.6.4.) und die Membranfraktion in 3 bzw. 4 aliquote Teile aufgeteilt, die anschließend unter den in den Tabellen 2-3 und 2-4 angegebenen Bedingungen solubilisiert wurden.

Innerhalb des untersuchten Bereiches von 0,25-2,0 % Triton X-100R wurde eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Detergenzkonzentration beobachtet (Tab. 2-3). Bei einer Konzentration von 0,5 % wurde in dem Solubilisat II. die höchste Aktivität (6,4 U) erhalten. Eine weitere Erhöhung der Detergenzkonzentration wirkte sich jedoch negativ auf die Enzymaktivität aus.

Tab. 2-3: Einfluß von Triton X-100R auf die Solubilisierungseffizienz. Membranfraktion aus 50 g Keimlingen (4 Aliquots), t: 45 min, T: 0 °C.

	Triton X-100R (% w/v)	Aktivität (U)
Rohextrakt	---	57,6
Überstand 1	---	3,6
Solubilisat I.	0,25	4,7
Solubilisat II.	0,5	6,4
Solubilisat III.	1,0	6,0
Solubilisat IV.	2,0	5,9

Im Vergleich zu der bisherigen Durchführung der Solubilisierung (t: 45 min, 0,5 % Triton X-100R) gelang weder durch eine Verkürzung noch Verlängerung der Solubilisierungsdauer eine nennenswerte Verbesserung der Effizienz (Tab. 2-4), so daß die anfangs gewählten Bedingungen in den folgenden Experimenten beibehalten wurden.

Tab. 2-4: Einfluß der Zeitdauer auf die Solubilisierungseffizienz. Membranfraktion aus 50 g Keimlingen (3 Aliquots), 0,5 % Triton X-100R, T: 0 °C.

	Zeit (min)	Aktivität (U)
Rohextrakt	---	58,4
Überstand 1	---	4,7
Solubilisat I.	30	7,8
Solubilisat II.	60	8,2
Solubilisat III.	120	8,1

2.8.2. Abfolge der chromatographischen Trennschritte

Von den in Vorversuchen getesteten chromatographischen Trennverfahren erwiesen sich die Gelpermeationschromatographie (GPC), Ionenaustauschchromatographie (IEC) und die Chromatographie an Hydroxylapatit (HAC) zur Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase als geeignet. Mit der Affinitätschromatographie an Heparin und der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) wurde dagegen kein zufriedenstellendes Resultat erzielt, so daß nur die zuerst genannten Verfahren für die Aufreinigung der Lyase eingesetzt wurden.

Abb. 2-26 zeigt die Abfolge der chromatographischen Trennschritte. Aktive Fraktionen wurden durch Ultrafiltration (UF) in Zentrifugationseinsätzen mit einer Trennmembran von 100 kDa aufkonzentriert, wobei gleichzeitig eine Umpufferung mit dem für den nächsten Schritt erforderlichen Startpuffer stattfand (vgl. 4.6.5).

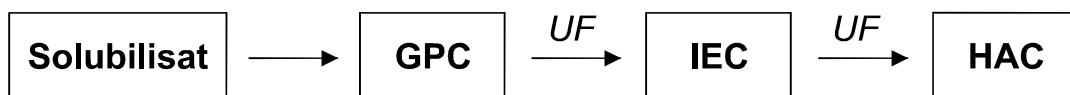


Abb. 2-26: Schema der Enzymaufreinigung.

2.8.2.1. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Aufreinigung des Enzyms war mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Während der gesamten chromatographischen Aufreinigungsschritte war die Anwesenheit von Triton X-100R in dem jeweiligen Eluenten von entscheidender Bedeutung, um eine Adsorption des Enzyms an dem Phasenmaterial zu verhindern. Abb. 2-27 und 2-28 belegen dies am Beispiel der GPC (vgl. 4.2.3.). In Gegenwart von 0,1 % Triton X-100R eluierte die Hydroperoxid-Lyase in einem Bereich von ca. 12,5-16,5 min (Abb. 2-27). Wurde dagegen auf das Detergenz verzichtet, so war in den aufgefangenen Fraktionen keine Enzymaktivität mehr nachweisbar (Abb. 2-28).

Im Anschluß an die GPC wurden die Fraktionen mit Hydroperoxid-Lyase-Aktivität durch Ultrafiltration aufkonzentriert und mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt (vgl. 4.2.5.).

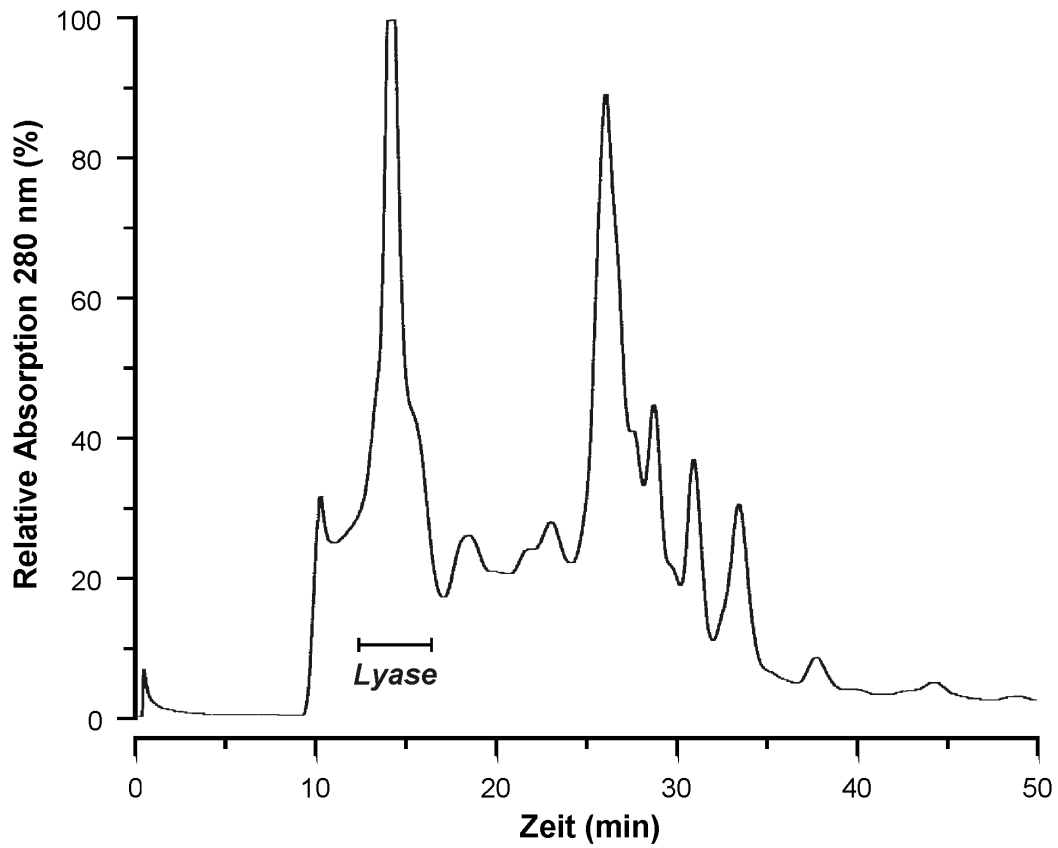


Abb. 2-27: Gelpermeationschromatographie in Gegenwart von 0,1 % Triton X-100R.

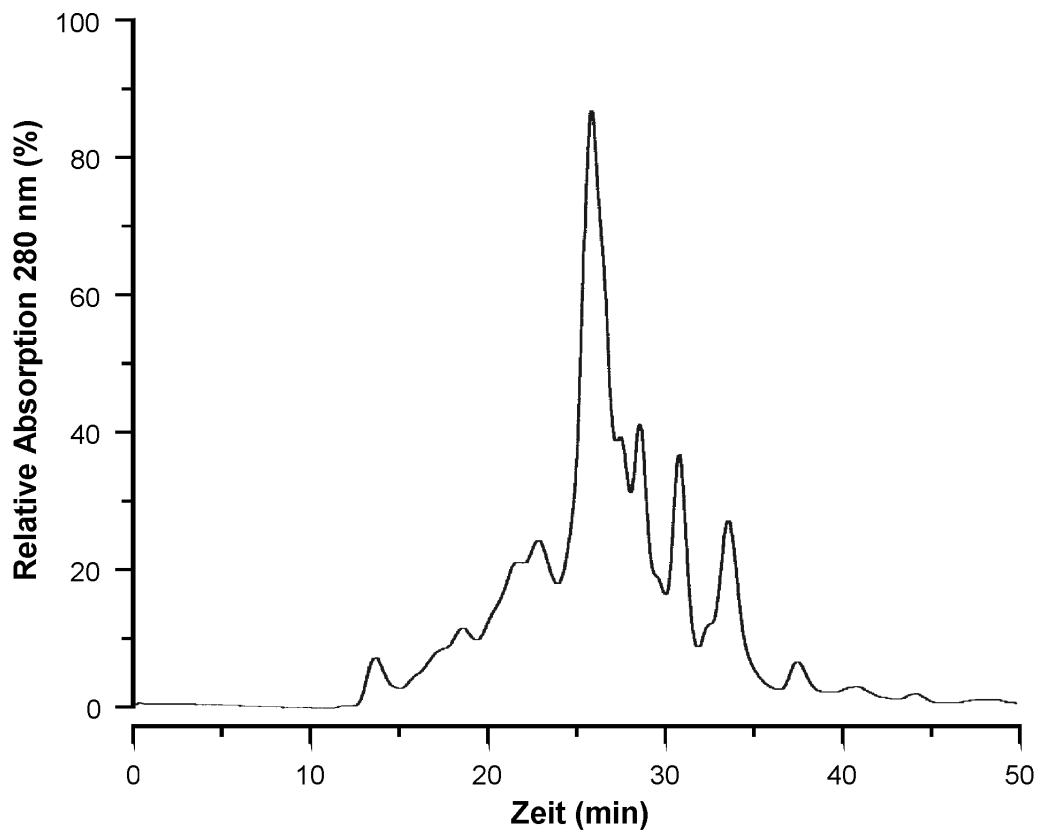


Abb. 2-28: Gelpermeationschromatographie ohne Triton X-100R.

2.8.2.2. Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Als Phasenmaterial bei der IEC wurde ein stark basischer Anionenaustauscher verwendet (vgl. 4.2.5.). Die Hydroperoxid-Lyase eluierte in den Fraktionen 15-18, wobei das Maximum der Enzymaktivität (vgl. 4.8.2.1.) mit 75 % auf die Fraktionen 15-16 entfiel (Abb. 2-29). Wie aus dem Verlauf der Absorption bei 280 nm und der Verteilung der Aktivität erkannt werden konnte, stellte die IEC ein sehr effizientes Trennprinzip dar, da der größte Teil des in dem GPC-Konzentrat enthaltenen Proteins ab einer Retentionszeit von ca. 27 min eluierte und so von der Hydroperoxid-Lyase abgetrennt wurde.

Im UV-Assay (vgl. 4.8.2.2.), der zum schnellen qualitativen Nachweis Hydroperoxid-metabolisierender Enzyme diente, wurde zusätzlich zu den Fraktionen 15 und 16 in Fraktion 18 ein weiteres Maximum beobachtet. Allerdings war in Fraktion 18 die gaschromatographisch bestimmte Konzentration von Hexanal nur sehr gering. Da andere flüchtige Produkte nicht nachgewiesen werden konnten, lag somit die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um ein Enzym handelte, das möglicherweise nichtflüchtige Produkte bildete.

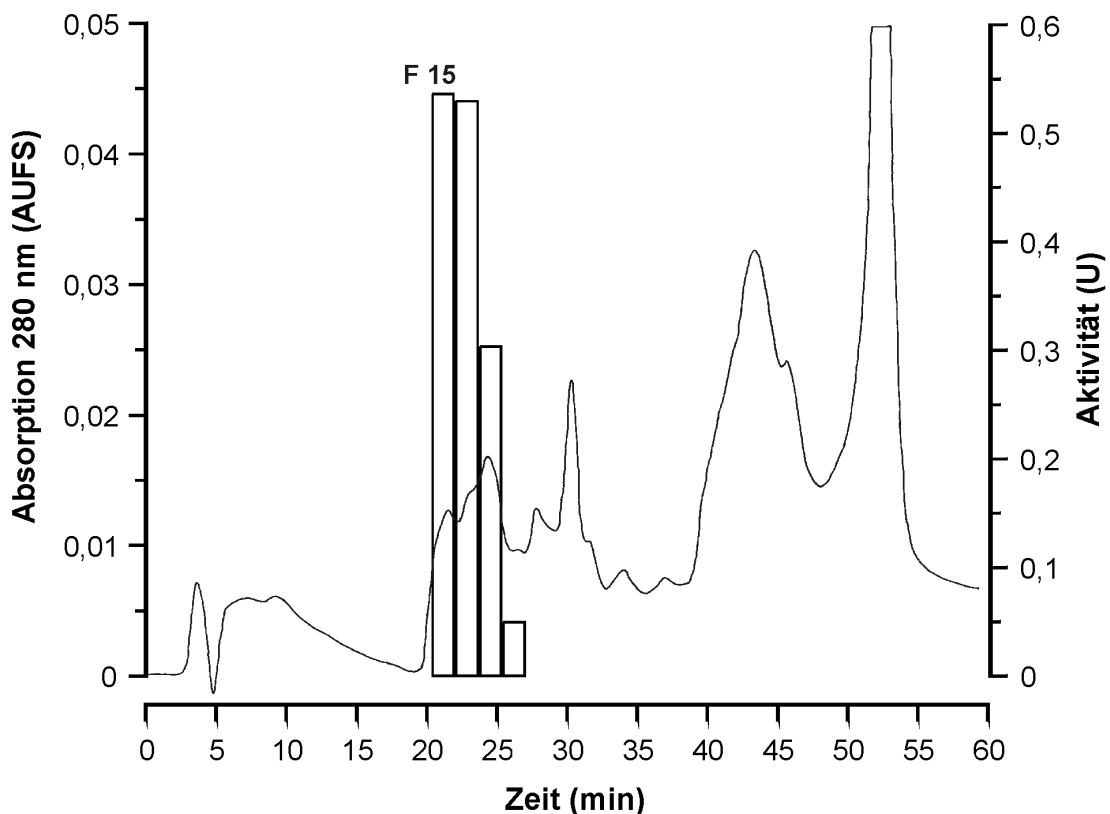


Abb. 2-29: Ionenaustauschchromatographie. In den Fraktionen (1,5 min) wurde die Hydroperoxid-Lyase-Aktivität (Balken) mittels GC-Assay bestimmt. Die Elution wurde bei 280 nm (—) verfolgt. Das Totvolumen des Systems von 1,5 ml (= 0,5 min) wurde bei der Darstellung der Aktivität berücksichtigt.

2.8.2.3. Chromatographie an Hydroxylapatit (HAC)

Die bei der IEC erhaltenen Fraktionen 15 und 16 wurden vereint, aufkonzentriert und an Hydroxylapatit chromatographiert (vgl. 4.2.4.). Trotz einer Detektorempfindlichkeit von 0,02 AUFS (zweitempfindlichste Einstellung) konnte bei einer Wellenlänge von 280 nm in dem Abschnitt, in dem die Lyase erwartet wurde, nur eine kleine Erhebung in der stark ansteigenden Grundlinie beobachtet werden. In diesen Fraktionen war eine Hydroperoxid-metabolisierende Enzymaktivität nur mit dem im Vergleich zum GC-Assay (vgl. 4.8.2.1.) empfindlicheren UV-Assay (vgl. 4.8.2.2.) nachweisbar. Allerdings war eine quantitative Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit mit dem UV-Assay wegen des geringen Linearitätsbereiches (ca. 0-2 min) und der Störanfälligkeit (Messung bei 235 nm, unspezifischer Assay) nicht möglich.

Da dieses Chromatogramm nicht geeignet war, den Elutionsverlauf an Hydroxylapatit zu dokumentieren, wird von einer Darstellung abgesehen und stattdessen das Chromatogramm eines nicht aufgereinigten Solubilisates gezeigt (Abb. 2-30).

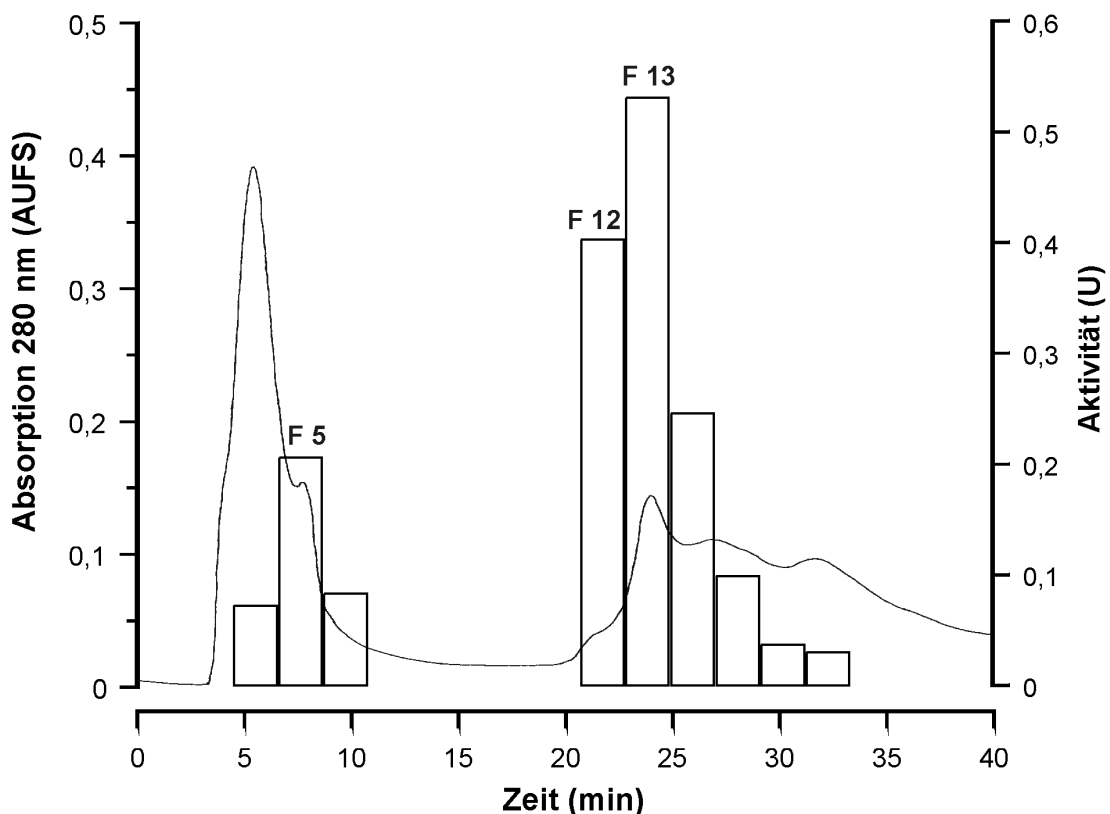


Abb. 2-30: Chromatographie an Hydroxylapatit. In den Fraktionen (2 min) wurde die Hydroperoxid-Lyase-Aktivität (Balken) mittels GC-Assay bestimmt. Die Elution wurde bei 280 nm (—) verfolgt. Das Totvolumen des Systems von 1,5 ml (= 1,5 min) wurde bei der Darstellung der Aktivität berücksichtigt.

Es wurden zwei deutlich voneinander getrennte Bereiche (Fraktionen 4-6 und 12-17) erhalten, die Hydroperoxid-Lyase-Aktivität aufwiesen (Abb. 2-30). Auf den später eluierenden Bereich entfielen 79 % der in den Fraktionen aufgefangenen Gesamtaktivität, wobei sich das Maximum (55 %) in den Fraktionen 12 und 13 befand. Die Aktivität in den Fraktionen 4-6 wurde durch das Phasenmaterial nicht oder nur in einem geringen Ausmaß retardiert. Hierbei konnte es sich z. B. um sehr kleine Membranfragmente mit Hydroperoxid-Lyase-Aktivität handeln, die bei dem Abpipettieren des Solubilisates nach der Zentrifugation möglicherweise aufgewirbelt wurden und trotz Membranfiltration (0,45 µm) in das Solubilisat gelangten oder um ein Isoenzym.

2.8.2.4. Bilanzierung der Enzymaufreinigung

Die bei der Aufarbeitung von 80 g Keimlingen (vgl. 4.6.4.) erhaltene Bilanz wird in Tab. 2-5 gezeigt. Bereits bei dem ersten chromatographischen Trennschritt (GPC) trat ein hoher Verlust an aktivem Enzym von 55 % auf, während sich der Aufreinigungsfaktor gegenüber dem Solubilisat kaum erhöhte. Bei der nachfolgenden IEC wurden sogar 70 % der Enzymaktivität eingebüßt, so daß letztendlich die Gesamtausbeute nur 5,4 % betrug.

Tab. 2-5: Bilanzierung der partiellen Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase.

	Protein ^a (mg)	Aktivität ^b (U)	Spezifische Aktivität (U mg ⁻¹)	Ausbeute (%)	Aufreinigungsfaktor (-fach)
Rohextrakt	834	69	0,082	100	1
Solubilisat	58	26	0,445	39	5,5
GPC	19,5	11,8	0,551	15,7	6,4
IEC	< 0,9	3,7	> 4,1	5,4	> 50
HAC	n. b.	+ ^c	?	?	?

^a: Bestimmung nach Lowry (vgl. 4.8.1.2.)

^b: GC-Assay (vgl. 4.8.2.1.)

^c: nur im UV-Assay (vgl. 4.8.2.2.) nachweisbar

n. b.: nicht bestimmt

Eine exakte Kalkulation des Aufreinigungsfaktors wurde dadurch verhindert, daß die Proteinkonzentration in den IEC-Fraktionen (F 15, 16) unter die Bestimmungsgrenze des Protein-Assays von 29 µg mL⁻¹ Probelösung absank. Wurde die Bestimmungsgrenze zur Berechnung von Gesamtprotein, spezifischer Aktivität und der Aufreinigung

herangezogen, so ergab sich mindestens eine 50-fache Aufreinigung. Selbst nach Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration um den Faktor 6 wurde die Bestimmungsgrenze noch nicht überschritten, so daß der Aufreinigungsfaktor vermutlich noch größer war (> 300). Allerdings besitzt diese Annahme nur dann Gültigkeit, wenn keine Enzymverluste durch Adsorption in den Ultrafiltrationseinsätzen eintraten.

2.8.3. Verkürzung der Enzymbaufreinigung

Bei der vorgestellten Methodik zur Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase lagen nach der IEC nur noch 5,4 % der Anfangsaktivität vor (vgl. 2.8.2.4.). Um diesen starken Aktivitätsverlust einzuschränken, wurde die Anzahl der Trennschritte reduziert, wobei sich gleichzeitig die Dauer der Aufarbeitung und Enzymbaufreinigung von zwei Tagen auf einen Tag verringerte. Da bei der GPC kaum eine Aufreinigung erzielt wurde, wurde auf diesen Schritt verzichtet und das Solubilisat direkt zur IEC eingesetzt (Abb. 2-31).

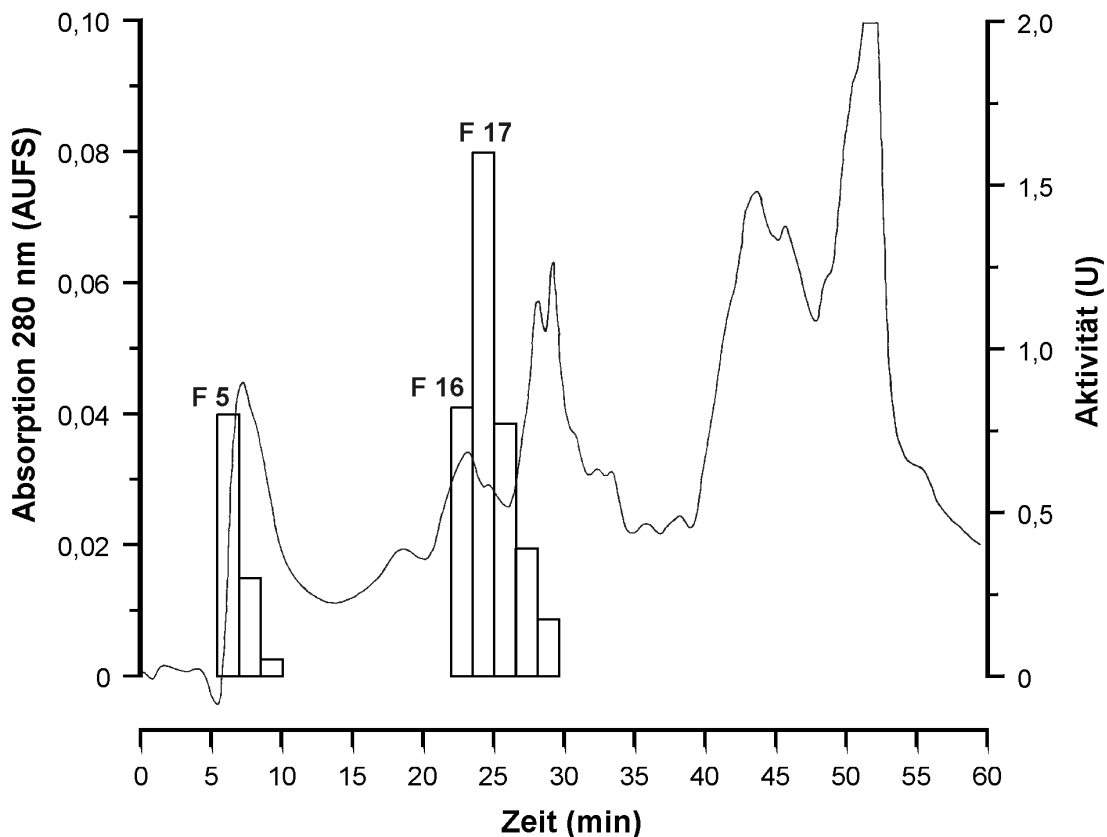


Abb. 2-31: Ionenaustauschchromatographie (verkürzte Aufreinigung). In den Fraktionen (1,5 min) wurde die Hydroperoxid-Lyase-Aktivität (Balken) mittels GC-Assay bestimmt. Die Elution wurde bei 280 nm (—) verfolgt. Das Totvolumen des Systems von 1,5 ml (= 0,5 min) wurde bei der Darstellung der Aktivität berücksichtigt.

Wie auch schon bei der Chromatographie des Solubilisates an Hydroxylapatit festgestellt wurde (vgl. 2.8.2.3.), eluierte die Hydroperoxid-Lyase in zwei Zonen des Chromatogramms (Fraktionen 5-7 und 16-20). Der Anteil der späteren Fraktionen an der aufgefängenen Gesamtaktivität betrug 77 % und repräsentierte vermutlich den Anteil tatsächlich solubilisierter Hydroperoxid-Lyase in dem Solubilisat.

Die Ergebnisse der verkürzten Enzymaufreinigung, durchgeführt mit 80 g Keimlingen, sind in Tab. 2-6 zu einer Bilanz zusammengefaßt. Ein kritischer Schritt war, wie auch schon in der Vergangenheit beobachtet, die Solubilisierung der Membranfraktion, die zu einer mäßigen Ausbeute von nur 36,8 % führte. Der Erfolg einer Verringerung der Trennschritte zeigte sich darin, daß nach der IEC noch 21,9 % der Anfangsaktivität vorlagen und gleichzeitig ein Aufreinigungsfaktor > 117 erreicht wurde. Da der Proteingehalt in den aktiven Fraktionen (F 16-18) wiederum weniger als 29 µg mL⁻¹ Probe-lösung betrug, wurden die spezifische Aktivität und der Aufreinigungsfaktor mit der Bestimmungsgrenze berechnet. Berücksichtigte man, daß nach der Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration um den Faktor 2,5 die Proteinkonzentration für eine Quantifizierung immer noch zu gering war, so lag der Aufreinigungsfaktor bei ca. 300.

Tab. 2-6: Bilanzierung der partiellen Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase (verkürzte Aufreinigungsmethodik).

	Protein ^a (mg)	Aktivität ^b (U)	Spezifische Aktivität (U mg ⁻¹)	Ausbeute (%)	Aufreinigungs- faktor (-fach)
Rohextrakt	1.017	73	0,0719	100	1
Solubilisat	62	27	0,4339	36,8	6
IEC	< 1,9	16	> 8,421	21,9	> 117

^a: Bestimmung nach Lowry (vgl. 4.8.1.2.)

^b: GC-Assay (vgl. 4.8.2.1.)

2.8.4. Stabilität solubilisierter Hydroperoxid-Lyase

Um die Stabilität solubilisierter Hydroperoxid-Lyase zu untersuchen, wurde die Membranfraktion aus 50 g Keimlingen in drei aliquote Teile aufgeteilt und bei unterschiedlichen pH-Werten in 5 mL 50 mM Phosphat-Puffer (0,5 % Triton X-100R) solubilisiert (vgl. 4.6.4.). Die hierbei erhaltenen Solubilisate wurden 1:5 (v/v) verdünnt und anschließend bei +4 °C bzw. -30 °C gelagert. Durch die Verdünnung wurde eine Konzentration der Lyase erhalten, wie sie auch in etwa während der Enzymaufreinigung in den

Fractionen vorlag (IEC: F16-20: 0,04-0,36 U mL⁻¹, vgl. 2.8.3.). Kriterium für die Auswahl des alkalischen pH-Bereiches von 7-9 waren die während der Chromatographie vorherrschenden Bedingungen (pH 7,2 bzw. 7,8). Die Aktivität der Solubilisate am Tag 1 wurde zur Angabe der relativen Aktivität jeweils 100 % gleichgesetzt.

Die Lyase erwies sich als sehr instabil, wobei das Ausmaß des Aktivitätsverlustes sowohl von dem pH-Wert als auch von der Lagerungstemperatur abhing. Bei +4 °C waren in den bei pH 8 und 9 solubilisierten Membranfraktionen bereits am 2. Tag (1 d nach der Aufarbeitung) nur noch ca. 25 % der Anfangsaktivität feststellbar (Abb. 2-32). Im Vergleich dazu war der Aktivitätsverlust bei pH 7 nach einem Tag nicht so stark ausgeprägt und betrug nur 45 %. Innerhalb der nächsten Tage nahm die Aktivität weiter ab und lag zum Schluß bei 6 % (pH 8), 12 % (pH 9) bzw. 17 % (pH 7).

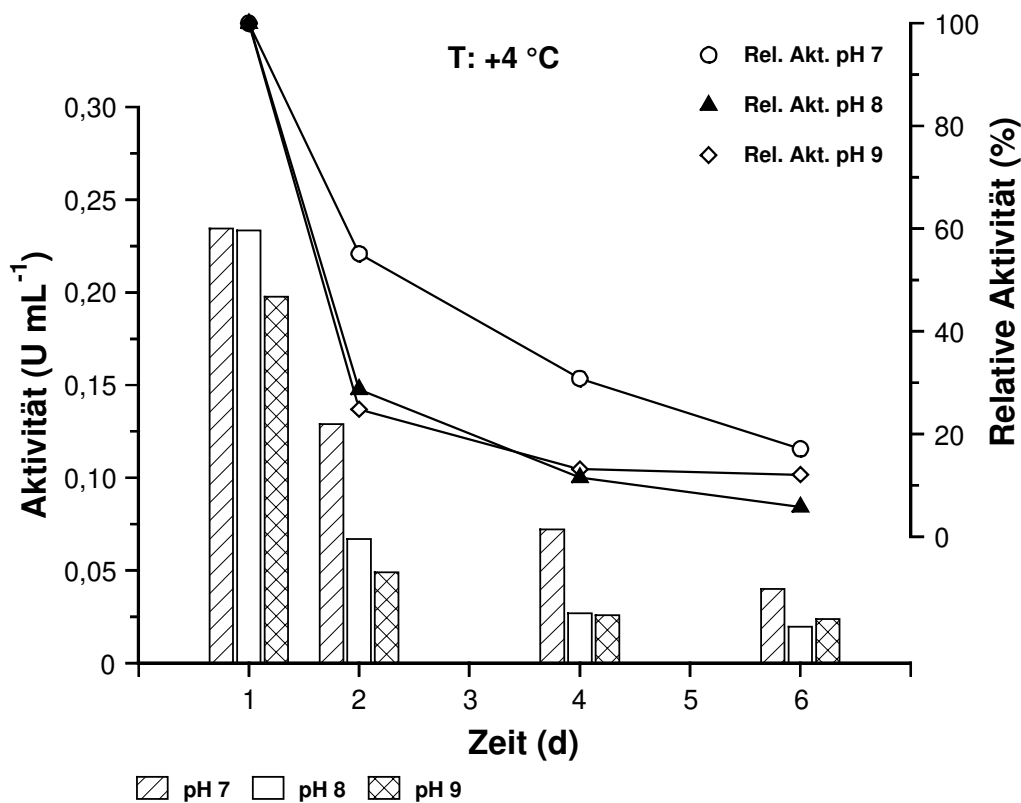


Abb. 2-32: Stabilität solubilisierter Hydroperoxid-Lyase in Abhängigkeit vom pH-Wert (Lagerung bei +4 °C).

Die Lagerung im Gefrierschrank bei -30 °C trug dazu bei, daß die Inaktivierung der Lyase langsamer stattfand als bei +4 °C, wobei sich pH 7 wiederum als am günstigsten für die Enzymaktivität herausstellte (Abb. 2-33). So waren am 2. Tag noch 89 % (pH 7), 66 % (pH 8) und 43 % (pH 9) der Anfangsaktivität vorhanden. Am Ende des untersuchten Zeitintervalls war die Aktivität bei allen pH-Werten ≥ 30 %. Im Gegensatz zu

dem exponentiellen Aktivitätsverlust bei pH 8 und pH 9 wurde bei pH 7 eine nahezu lineare Beziehung erhalten. Aus der Regressionsgeraden ($R: 0,9987$) wurde eine Halbwertszeit der Lyase von ca. 4 d berechnet.

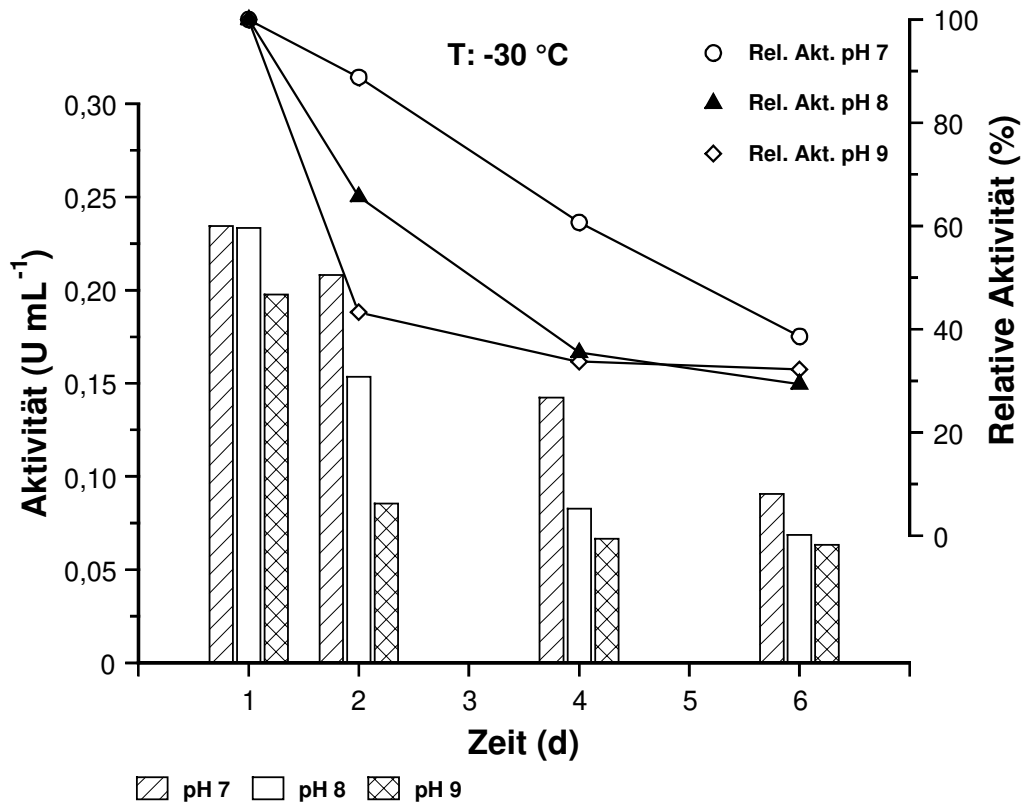


Abb. 2-33: Stabilität solubilisierter Hydroperoxid-Lyase in Abhängigkeit vom pH-Wert (Lagerung bei -30 °C).

Neben dem Einfluß von Temperatur und pH-Wert auf die Aktivität der Hydroperoxid-Lyase wurde untersucht, ob sich mit einem Zusatz verschiedener Additive eine größere Stabilität des Enzyms und eine höhere Solubilisierungseffizienz erzielen ließen. Die Membranfraktion aus 65 g Keimlingen wurde nach Aliquotierung (4 Teile) in Gegenwart unterschiedlicher Additive bei pH 7 in jeweils 10 mL 20 mM Phosphat-Puffer (0,5 % Triton X-100R) solubiliert (vgl. 4.6.4.). Als Proteinase-Inhibitoren wurden Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in einer Konzentration von 1 mM verwendet. Außerdem enthielt einer der Solubilisierungspuffer 0,25 M Natriumchlorid, da der Einfluß des bei der IEC verwendeten NaCl (Elution mit ansteigendem NaCl-Gradienten) auf die Enzymaktivität nicht bekannt war. Die Aktivität der Hydroperoxid-Lyase wurde am Tag der Aufarbeitung und nach dreitägiger Lagerung (Tag 4) des unverdünnten Solubisates bei -30 °C bestimmt. Zur Angabe der relativen Aktivität wurde die Anfangsaktivität der Solubisate jeweils 100 % gleichgesetzt.

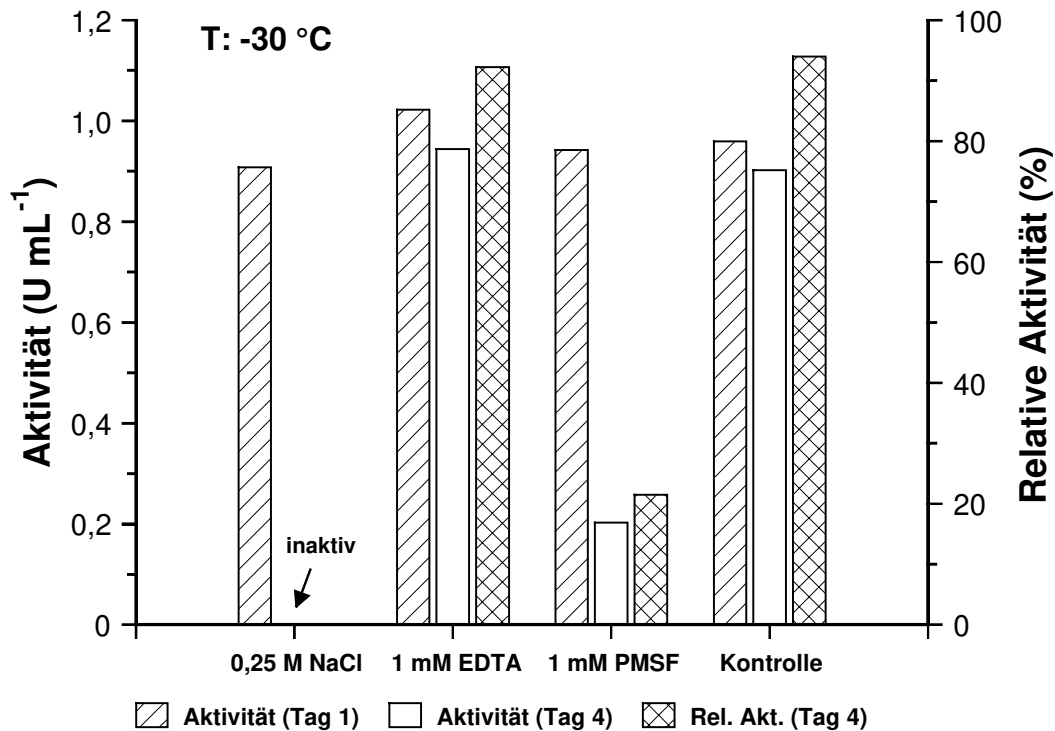


Abb. 2-34: Stabilität solubilisierter Hydroperoxid-Lyase in Anwesenheit verschiedener Additive (Lagerung bei -30 °C).

Die Effizienz der Solubilisierung wurde durch die Additive nicht beeinflusst, da die direkt nach der Solubilisierung gemessene Aktivität (Tag 1) bei den einzelnen Proben in etwa vergleichbar war (Abb. 2-34). Allerdings zeigten sich bei der Lagerung deutliche Unterschiede. Die Anwesenheit von 0,25 M NaCl hatte während der Lagerung eine vollständige Inaktivierung der Lyase zur Folge, wogegen unmittelbar nach der Solubilisierung im Vergleich zu der Kontrolle (Solubilisat ohne Additive) eine nur geringfügig verminderte Aktivität festgestellt werden konnte. PMSF zeigte ebenfalls einen inhibierenden Effekt, allerdings in einem geringeren Ausmaß als NaCl, so daß am Tag 4 noch 21 % Restaktivität vorlagen.

Erfreulich war dagegen, daß weder bei der Kontrolle noch bei dem EDTA-enhaltenen Solubilisat ein nennenswerter Aktivitätsverlust ($\leq 7\%$) während der Lagerung auftrat. Möglicherweise konnte dies darauf zurückgeführt werden, daß in diesem Experiment keine Verdünnung des Solubisates vor der Lagerung vorgenommen wurde.

2.9. Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase

2.9.1. Vergleich unterschiedlicher Gele

Die Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase erfolgte kovalent auf den kommerziell erhältlichen Gelen Affi-Gel 10, Affi-Gel 15, UltraLink Iodoacetyl (Iodacetyl) und Ultra-Link Biosupport Medium (Azlacton) (vgl. 4.1.5.). Zunächst wurde das mittels IEC aufgereinigte Enzym zur Immobilisierung eingesetzt. Allerdings war die Aktivität dieser Immobilisate aufgrund der verhältnismäßig geringen Enzymkonzentration äußerst niedrig, so daß die gebildete Produktmenge kaum noch gaschromatographisch bestimmt werden konnte (vgl. 4.8.2.1.). Im Vergleich dazu ergaben sich bei der Immobilisierung der Lyase direkt aus dem Solubilisat bedeutend höhere Produktkonzentrationen, so daß zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Parameter auf die Effizienz der Immobilisierung die letztere Verfahrensweise beibehalten wurde.

In Anlehnung an die Empfehlungen der Hersteller wurde das Enzym zunächst im alkalischen pH-Bereich immobilisiert (vgl. 4.7.1.). Hierzu wurde, in Abhängigkeit von dem für die Immobilisierung vorgesehenen Gel, die Membranfraktion in zwei Puffern (Tris (pH 8,5) bzw. Phosphat (pH 7,5)) solubilisiert, woraus Solubilisate mit unterschiedlicher Aktivität und Proteinkonzentration resultierten. Zur Immobilisierung auf Affi-Gel 15 und Azlacton wurde das in Phosphat-Puffer solubilierte Enzym eingesetzt (Aktivität: 1,960 U mL⁻¹, Protein: 3,27 mg mL⁻¹), während die Immobilisierung auf Iodacetyl mit der in Tris-Puffer solubilierten Lyase (Aktivität: 2,277 U mL⁻¹, Protein: 5,14 mg mL⁻¹) durchgeführt wurde.

In Gegenwart von Na-Citrat, das laut Herstellerangaben die Kupplungseffizienz bei Azlacton erhöhen kann, wurden bei Affi-Gel 15 und Azlacton nur ca. 10 % der angegebenen Hydroperoxid-Lyase immobilisiert, während bei Iodacetyl die Aktivitätseffizienz (vgl. 4.8.3.) mit ca. 18 % fast doppelt so hoch war (Abb. 2-35). Da mit Affi-Gel 10 in Vorversuchen schlechtere Ergebnisse erhalten wurden als mit Affi-Gel 15, wurde es in diesem Experiment nicht noch einmal untersucht.

Der Vollständigkeit halber sind in Tab. 2-7 die immobilisierte Proteinmenge und die Kupplungseffizienz angegeben (vgl. 4.8.3.). Vermutlich macht aber die Hydroperoxid-Lyase nur einen sehr geringen Anteil am Gesamtprotein aus, so daß sich hieraus keine eindeutigen Rückschlüsse auf die tatsächliche Menge an immobilisierter Hydroperoxid-Lyase ziehen lassen.

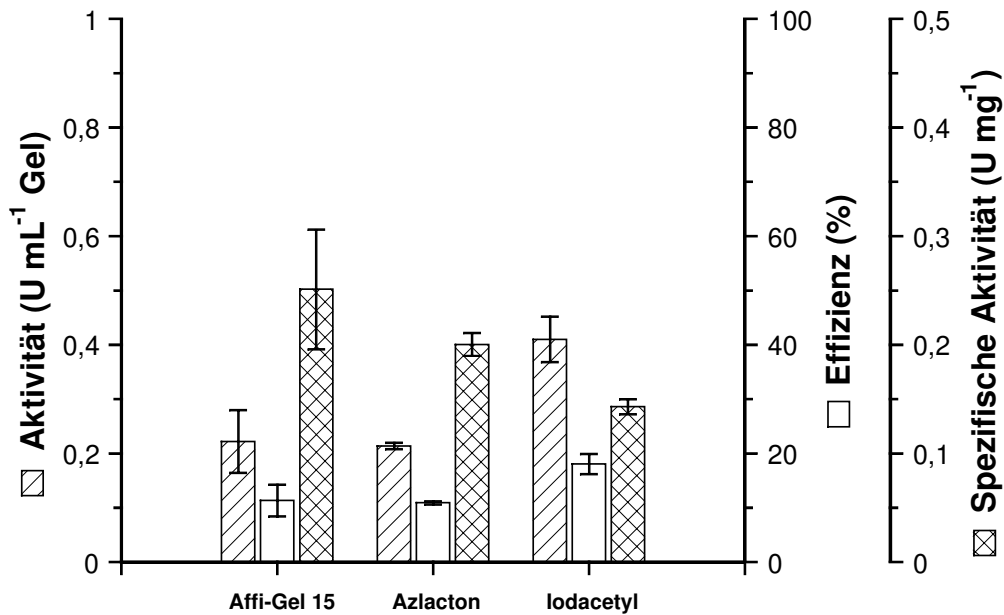


Abb. 2-35: Vergleich unterschiedlicher Gele mit Na-Citrat-Zusatz (0,4 M). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 Immobilisierungsansätzen und die Schwankungsbreite.

Tab. 2-7: Kupplungseffizienz verschiedener Gele mit Na-Citrat-Zusatz (0,4 M). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 Immobilisierungsansätzen und die Schwankungsbreite.

Gel	Protein (mg mL ⁻¹ Gel)	Kupplungseffizienz (%)
Affi-Gel 15	0,88 ± 0,04	26,8 ± 1,2
Azlacton	1,07 ± 0,03	32,7 ± 0,8
Iodacetyl	2,87 ± 0,15	55,7 ± 2,9

Der Versuch wurde mit Ausnahme eines Zusatzes von Na-Citrat unter identischen Bedingungen wiederholt, wobei in den jeweiligen Solubilisaten die Aktivität 2,008 U mL⁻¹ (Affi-Gel 15, Azlacton) bzw. 2,047 U mL⁻¹ (Iodacetyl) und die Proteinkonzentration 2,75 mg mL⁻¹ (Affi-Gel 15, Azlacton) bzw. 5,02 mg mL⁻¹ (Iodacetyl) betrug.

Der Verzicht auf Na-Citrat bei der Immobilisierung führte bei Affi-Gel 15 und Iodacetyl zu einer deutlichen Erhöhung der Aktivitätseffizienz auf 19 % bzw. 47 % (Abb. 2-36). Im Gegensatz dazu war bei Azlacton die Aktivitätseffizienz ca. um den Faktor 3 erniedrigt und lag bei nur 2,5 %. Da mit Affi-Gel 15 wesentlich weniger Protein immobilisiert wurde als mit Iodacetyl (Tab. 2-8), ergab sich hieraus die höhere spezifische Aktivität von Affi-Gel 15 (Abb. 2-36).

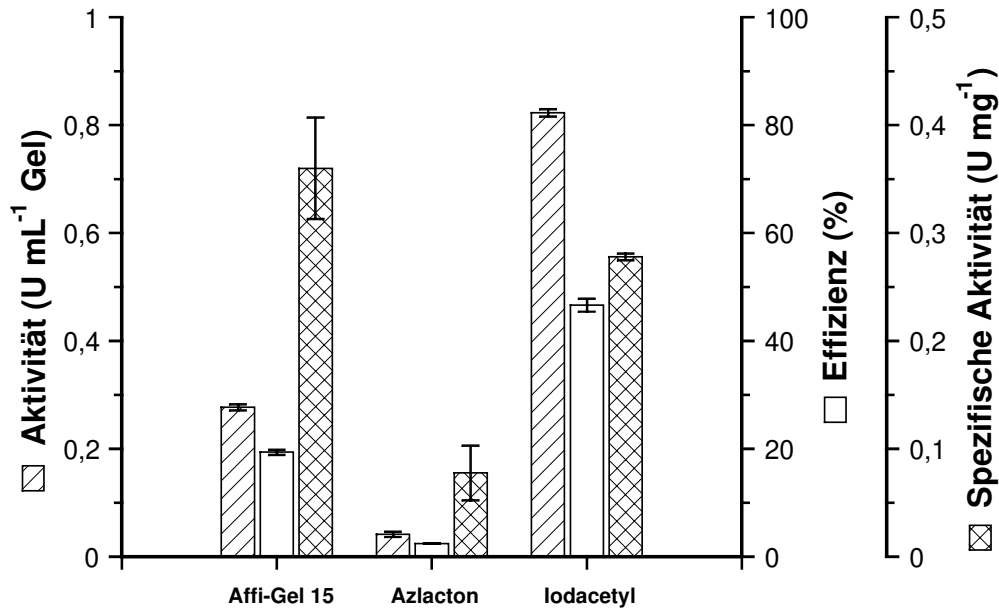


Abb. 2-36: Vergleich unterschiedlicher Gele ohne Na-Citrat-Zusatz. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 Immobilisierungsansätzen und die Schwankungsbreite.

Tab. 2-8: Kupplungseffizienz verschiedener Gele ohne Na-Citrat-Zusatz. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 Immobilisierungsansätzen und die Schwankungsbreite.

Gel	Protein (mg mL ⁻¹ Gel)	Kupplungseffizienz (%)
Affi-Gel 15	0,79 ± 0,12	40,1 ± 6,2
Azlacton	0,60 ± 0,21	26,2 ± 9,1
Iodacetyl	2,96 ± 0,01	68,5 ± 2,6

Aufgrund der höheren Aktivitätseffizienz des **UltraLink Iodoacetyl** wurde dieses Gel in den weiteren Experimenten zur Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase ausgewählt.

2.9.2. Optimierung der Immobilisierungsbedingungen

2.9.2.1. Temperatur

Da es sich bei der Hydroperoxid-Lyase um ein relativ instabiles Enzym handelt (vgl. 2.8.4.), wurde versucht, durch Absenkung der Immobilisierungstemperatur einen temperaturbedingten Aktivitätsverlust weitgehend einzuschränken. Im Gegensatz zum vorangegangenen Versuch (vgl. 2.9.1.), in dem die Immobilisierung 1 h bei Raumtem-

peratur durchgeführt wurde, erfolgte nun die Immobilisierung (250 μL Gel, 1 mL Solubilisat (0,1 M Tris-Puffer pH 8, 0,5 % Triton X-100R)) im Kühlschrank bei +4 °C, wobei durch eine längere Immobilisierungszeit (1-3,5 h) einer möglichen Verschlechterung der Immobilisierung durch eine Verlangsamung der Kupplungsreaktion entgegengewirkt werden sollte. Die Aktivität in dem Solubilisat betrug 2,26 U mL⁻¹ und die Proteinkonzentration 4,37 mg mL⁻¹.

Es wurde zwar eine mit 2.9.1. vergleichbare Aktivität der Gele erhalten, da aber die aufgegebene Solubilisatmenge in diesem Versuch höher war, lag die Aktivitätseffizienz nur bei ca. 10 % (Abb. 2-37). Dies korrespondierte mit der ebenfalls niedrigen Kupplungseffizienz des Proteins von 4,6-8,9 % (Tab. 2-9). Eine Verlängerung der Immobilisierungsdauer von 1 h auf 2 h hatte eine nur geringfügige Erhöhung der Aktivität des Immobilisates zur Folge, während bei 3,5 h dagegen eine Abnahme der Aktivität beobachtet wurde. Im untersuchten Zeitraum nahm die spezifische Aktivität aufgrund der zunehmenden immobilisierten Proteinmenge kontinuierlich ab.

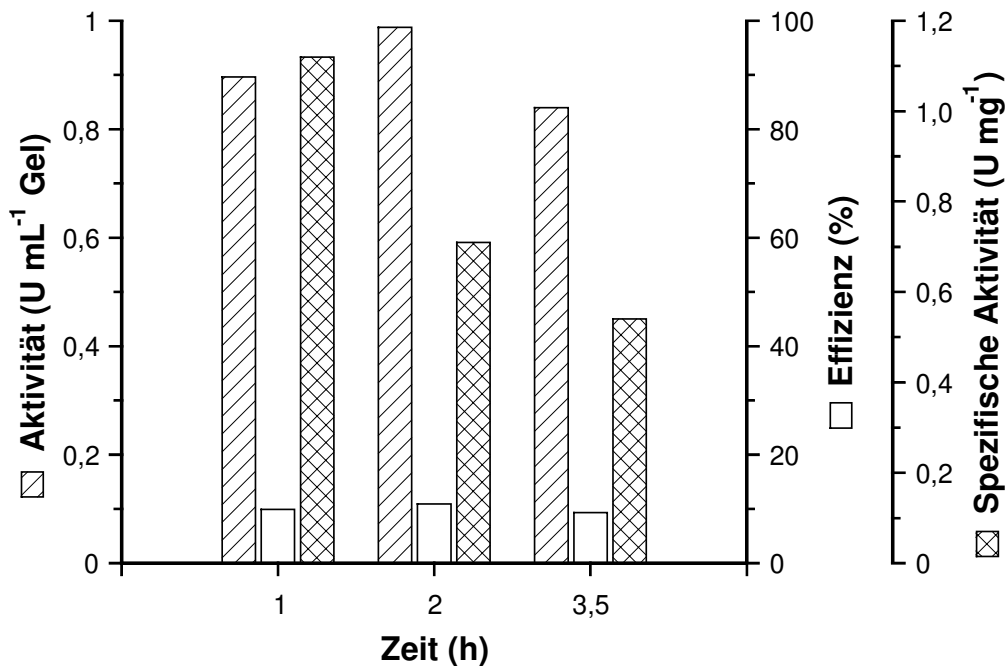


Abb. 2-37: Immobilisierung der Lyase bei +4 °C.

Tab. 2-9: Kupplungseffizienz bei +4 °C.

Zeit (h)	Protein (mg mL ⁻¹ Gel)	Kupplungseffizienz (%)
1	0,80	4,6
2	1,40	8,0
3,5	1,56	8,9

2.9.2.2. pH-Wert

In früheren Experimenten wurde festgestellt, daß die Hydroperoxid-Lyase besonders bei der Lagerung im Alkalischen rasch an Aktivität verlor (vgl. 2.8.4.). Da die Immobilisierung bislang bei pH 8,5 (UltraLink Iodoacetyl) durchgeführt wurde, was sich nachteilig auf die Enzymaktivität auswirken konnte, wurde die Effizienz der Immobilisierung bei niedrigeren pH-Werten untersucht.

Für die Solubilisierung der Membranfraktion (0,5 % Triton X-100R) wurde der für die anschließende Immobilisierung vorgesehene Puffer verwendet (vgl. 4.6.4.), so daß sich die jeweiligen Solubilisate in ihrer Aktivität und Proteinkonzentration unterschieden: pH 7: Aktivität: 1,226 U mL⁻¹, Protein: 1,99 mg mL⁻¹, pH 8: Aktivität: 1,301 U mL⁻¹, Protein: 3,12 mg mL⁻¹, pH 9: Aktivität: 1,296 U mL⁻¹, Protein: 3,17 mg mL⁻¹. Die Immobilisierung wurde mit 300 µL Gel, 300 µL des jeweiligen Solubisates und einem Zusatz von 700 µL Puffer ausgeführt, um die Detergenzkonzentration auf 0,15 % abzusenken (vgl. 4.7.2.).

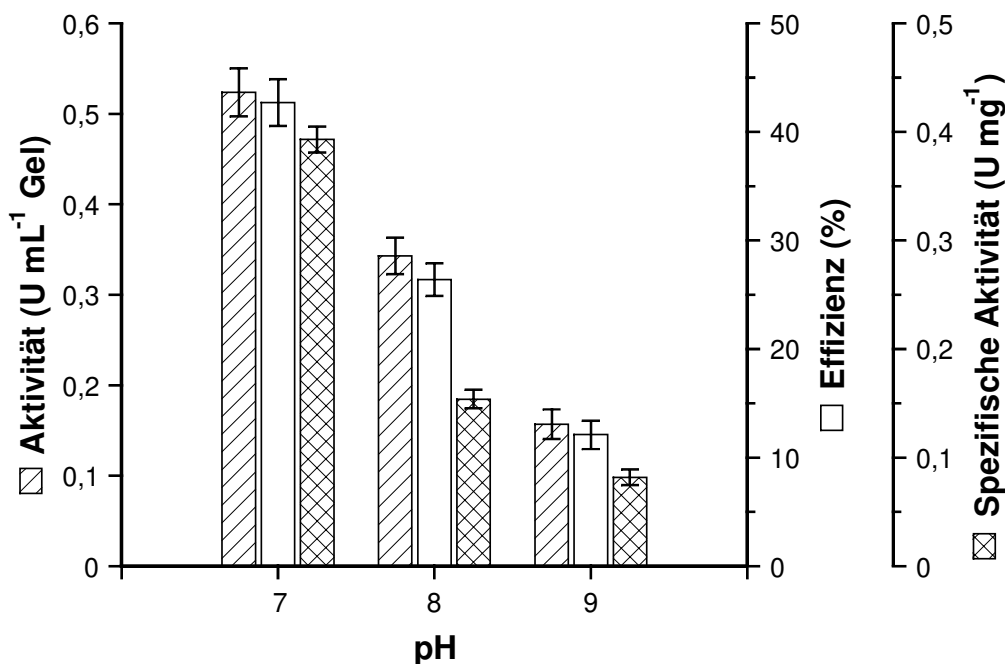


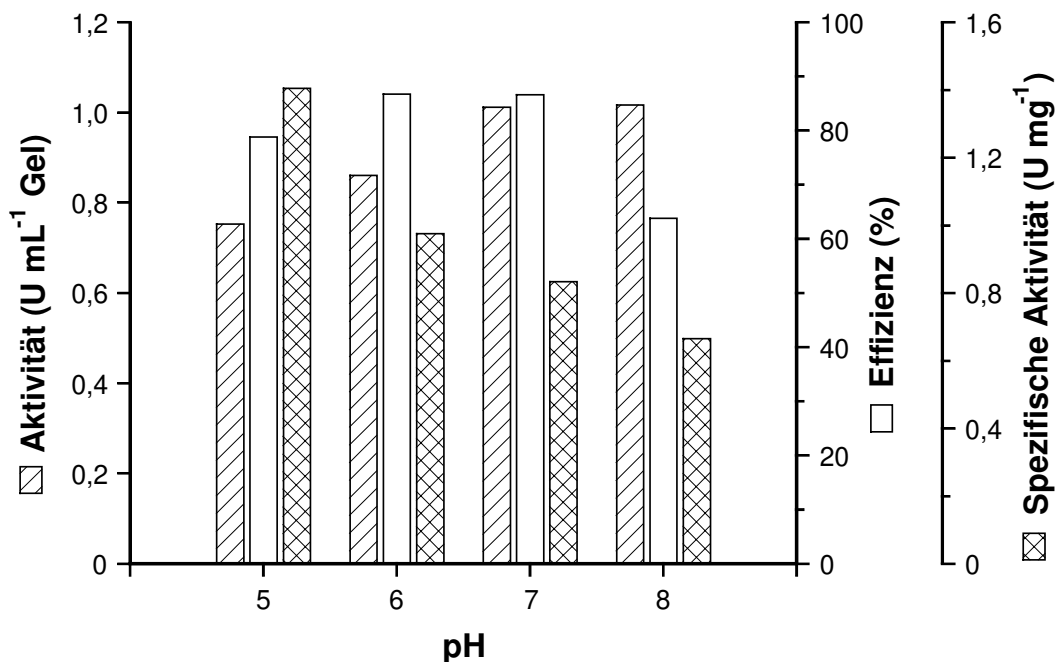
Abb. 2-38: Immobilisierung der Lyase bei pH 7-9. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 Immobilisierungsansätzen und die Schwankungsbreite.

Durch eine Verringerung des pH-Wertes konnte die Immobilisierung der Lyase deutlich verbessert werden (Abb. 2-38). Im Vergleich zu pH 9 war die Aktivität und Aktivitätseffizienz bei pH 7 ca. um den Faktor 3,5 höher, die spezifische Aktivität sogar um den Faktor 4,8. Hinsichtlich der Kupplungseffizienz traten keine so großen Unterschiede auf (Tab. 2-10).

Tab. 2-10: Kupplungseffizienz bei pH 7-9.

pH	Puffer	Protein (mg mL ⁻¹ Gel)	Kupplungseffizienz (%)
7	0,1 M Phosphat	1,33 ± 0,03	66,8 ± 1,35
8	0,1 M Tris	2,23 ± 0,01	71,5 ± 0,35
9	0,1 M Tris	1,89 ± 0,05	59,1 ± 1,05

Da bei pH 7 vermutlich noch nicht das Maximum der Aktivitätseffizienz erreicht worden war, wurde im nachfolgenden Experiment der pH-Bereich bis auf pH 5 erweitert. Abweichend von der bisherigen Durchführungsweise der Solubilisierung (vgl. 4.6.4.) wurde eine Detergenzkonzentration von 0,3 % (anstelle 0,5 %) verwendet, was eine weitere Absenkung der Detergenzkonzentration während der Immobilisierung ermöglichte, ohne das Gesamtvolumen des Ansatzes durch Verdünnung übermäßig zu erhöhen. Die zur Immobilisierung eingesetzten Solubilisate besaßen folgende Aktivitäten und Proteinkonzentrationen: pH 5: Aktivität: 0,795 U mL⁻¹, Protein: 0,64 mg mL⁻¹, pH 6: Aktivität: 0,828 U mL⁻¹, Protein: 1,18 mg mL⁻¹, pH 7: Aktivität: 0,972 U mL⁻¹, Protein: 1,52 mg mL⁻¹, pH 8: Aktivität: 1,326 U mL⁻¹, Protein: 1,93 mg mL⁻¹. Hiervon wurden 300 µL auf 250 µL Gel unter Zusatz von 500 µL Puffer immobilisiert, was einer Konzentration von 0,11 % Triton X-100R entsprach.

**Abb. 2-39: Immobilisierung der Lyase bei pH 5-8.**

Die Aktivitätseffizienz, die eine von der Ausgangsaktivität im Solubilisat unabhängige Beurteilung der Ergebnisse erlaubte, war bei pH 6 und 7 mit ca. 87 % am größten (Abb. 2-39). Infolge der mit zunehmendem pH-Wert ansteigenden Aktivität im Solubilisat wiesen allerdings die Immobilisate bei pH 7 und 8 die höchste absolute Aktivität auf (ca. 1 U mL⁻¹). Interessanterweise erfolgte die bei pH 5-7 durchgeführte Immobilisierung, verglichen mit dem jeweiligen Solubilisat, unter Zunahme der spezifischen Aktivität, so daß ein geringer Aufreinigungseffekt durch die Immobilisierung erzielt wurde.

Während für die einzelnen Immobilisierungsansätze eine unterschiedliche Proteinbeladung, was sich aus den verschiedenen Proteinkonzentrationen in den jeweils verwendeten Solubilisaten ergab, erhalten wurde, war die Kupplungseffizienz mit 62,2-69,7 % annähernd vergleichbar (Tab. 2-11).

Tab. 2-11: Kupplungseffizienz bei pH 5-8.

pH	Puffer	Protein (mg mL ⁻¹ Gel)	Kupplungseffizienz (%)
5	0,1 M Phosphat	0,54	69,7
6	0,1 M Phosphat	0,88	62,2
7	0,1 M Phosphat	1,22	66,4
8	0,1 M Phosphat	1,53	66,0

Aufgrund dieses Experimentes wurde für die Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase ein pH-Wert von 7 im Hinblick auf die absolute Aktivität des Gels und die Aktivitätseffizienz als optimal angesehen. Die etwas geringere spezifische Aktivität mußte allerdings als Nachteil in Kauf genommen werden.

2.9.2.3. Proteinkonzentration

Um ein Immobilisat mit möglichst hoher Hydroperoxid-Lyase-Aktivität zu erhalten, wurde bei konstantem Gelvolumen (250 µL) das zur Immobilisierung verwendete Volumen des Solubilisates (1,685 U mL⁻¹, Protein: 2,71 mg mL⁻¹) so variiert, daß die aufgegebene Proteinmenge (Protein_{aufg.}) in einem Bereich von 3,25-9,76 mg mL⁻¹ Gel lag (vgl. 4.7.2.). Der Immobilisierungsansatz wurde zum einen mit Solubilisierungspuffer (mit Triton X-100R) und zum anderen mit Puffer ohne Detergenz auf ein Volumen von 1,5 mL ergänzt. Hieraus resultierte während der Immobilisierung eine Detergenzkonzentration von 0,3 % bzw. von 0,1-0,3 %.

Mit zunehmender Proteinkonzentration nahm die Aktivität immobilisierter Lyase überproportional zu (Abb. 2-40). Allerdings lag bei der höchsten aufgegebenen Proteinkonzentration (900 μL Solubilisat) die Aktivität des Gels bei nur $1,26 \text{ U mL}^{-1}$, was in vorangegangenen Versuchen schon mit einem kleineren Solubilisatvolumen (300 μL , vgl. 2.9.2.2.) fast erreicht worden war. Die Aktivitätseffizienz fiel mit 4,8-20,8 % unerwartet niedrig aus.

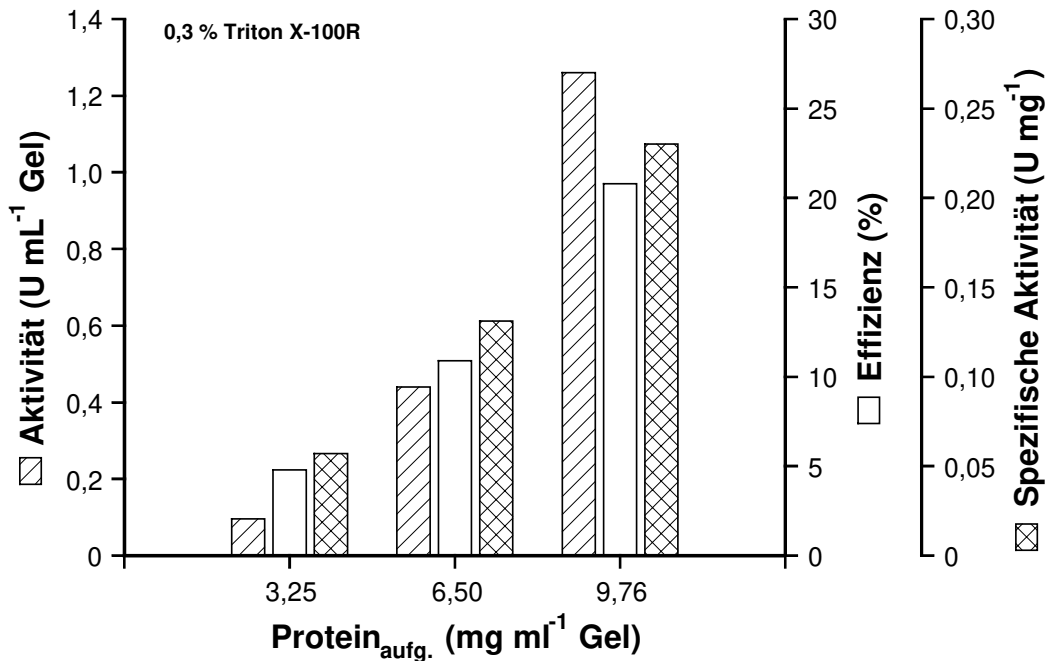


Abb. 2-40: Immobilisierung bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in Gegenwart von 0,3 % Triton X-100R.

Wurde die Immobilisierung mit den gleichen Proteinkonzentrationen (3,25-9,76 mg mL⁻¹ Gel), aber bei unterschiedlicher Detergenzkonzentration durchgeführt, so ergab sich ein völlig anderes Bild (Abb. 2-41). Mit abnehmender Protein- bzw. Detergenzkonzentration erhöhte sich die Aktivitätseffizienz deutlich und erreichte mit 57 % bei 0,1 % Triton X-100R ein Maximum. Die Aktivität des Gels lag bei allen drei Ansätzen in einem relativ ähnlichen Bereich von 1,16-1,30 U mL⁻¹. Für beide in Anwesenheit von 0,3 % Triton hergestellten Immobilisate (Abb. 2-40, 2-41) wurde ein nahezu identisches Resultat erhalten, was die Reproduzierbarkeit der Immobilisierung demonstrierte.

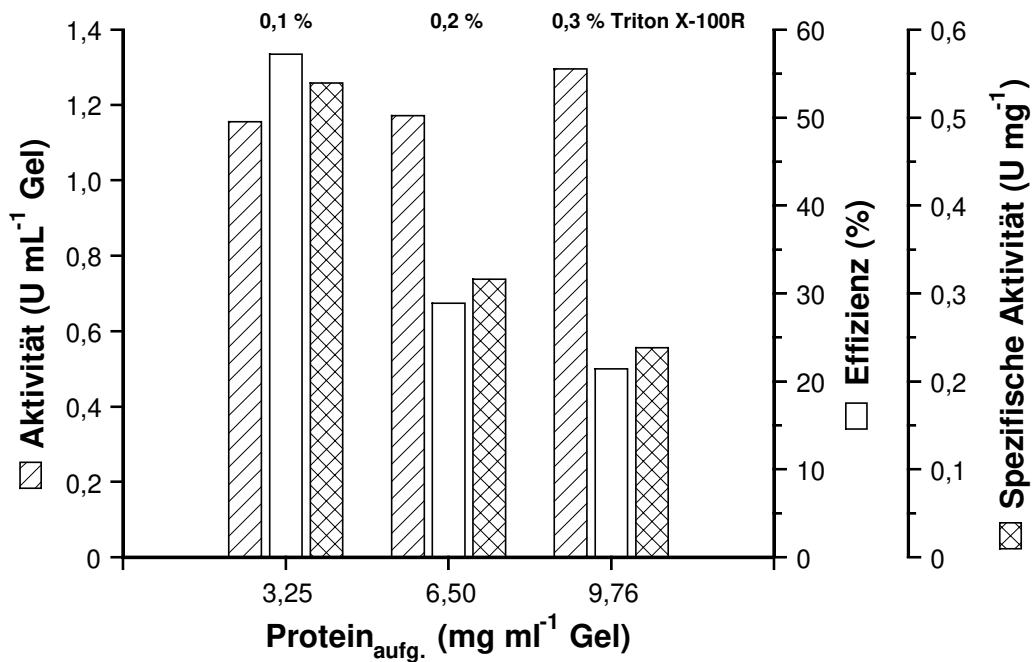


Abb. 2-41: Immobilisierung bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in Gegenwart von 0,1-0,3 % Triton X-100R.

Die Kupplungseffizienzen sind in Tab. 2-12 dargestellt.

Tab. 2-12: Kupplungseffizienz bei unterschiedlicher Protein- und Detergenzkonzentration.

Protein _{aufg.} (mg mL ⁻¹ Gel)	Triton X-100R (%)	Protein _{imm.} (mg mL ⁻¹ Gel)	Kupplungseffizienz (%)
3,25	0,3	1,67	51,5
6,50	0,3	3,35	51,5
9,76	0,3	5,48	56,2
3,25	0,1	2,18	67,2
6,50	0,2	3,70	56,8
9,76	0,3	5,44	55,8

2.9.2.4. Detergenzkonzentration

In den bisher beschriebenen Experimenten erfolgte die Immobilisierung bei wechselnden Detergenzkonzentrationen, was offensichtlich die Aktivitätseffizienz auch beeinflusste (vgl. 2.9.2.3.). Daher wurde die Wirkung des Detergenz auf die Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase detaillierter untersucht, indem 300 µL Solubilisat (1,139 U

mL^{-1} , Protein: $2,35 \text{ mg mL}^{-1}$) in Gegenwart von 0,1-1,0 % Triton X-100R auf 250 μL Gel immobilisiert wurden (Puffervolumen: 0,9 mL) (vgl. 4.7.2.).

Mit 75,7 % wurde die höchste Aktivitätseffizienz bei einer Detergenzkonzentration von 0,1 % Triton X-100R erzielt (Abb. 2-42). Bereits ab 0,2 % Triton X-100R trat dagegen eine drastische Verringerung der Effizienz auf 11 % ein, und ab 0,3 % Triton X-100R lagen alle folgenden Werte unter 6 %. In einem zweiten, unabhängigen Experiment konnte dieses Resultat in bezug auf die Aktivitätseffizienz wiederholt werden; die absolute Aktivität des Gels war jedoch aufgrund der geringeren Aktivität im Solubilisat niedriger.

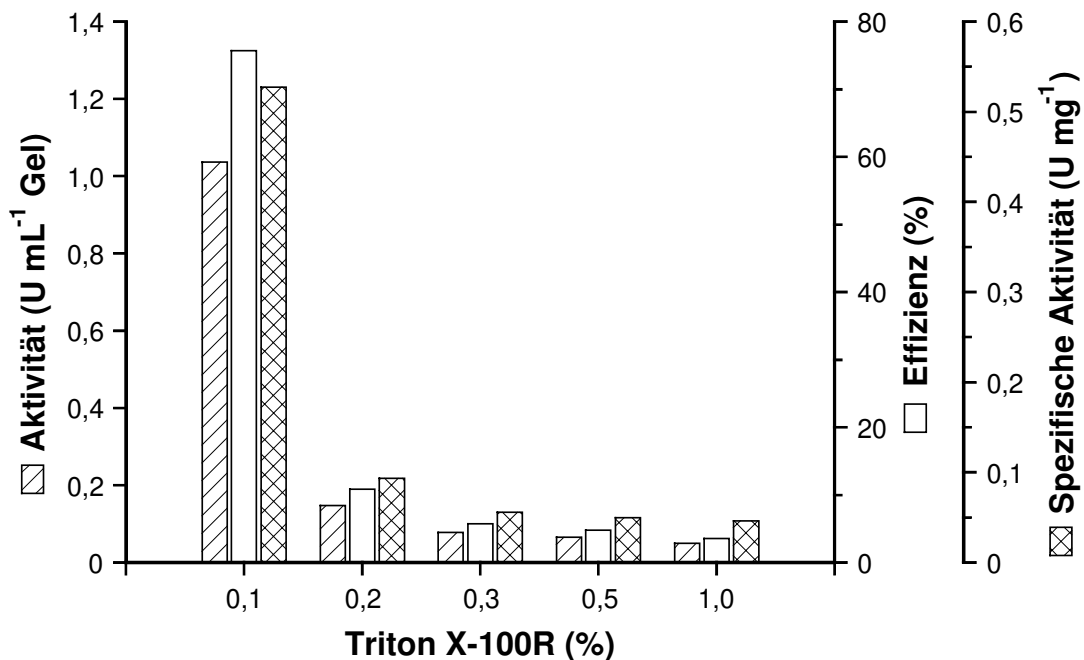


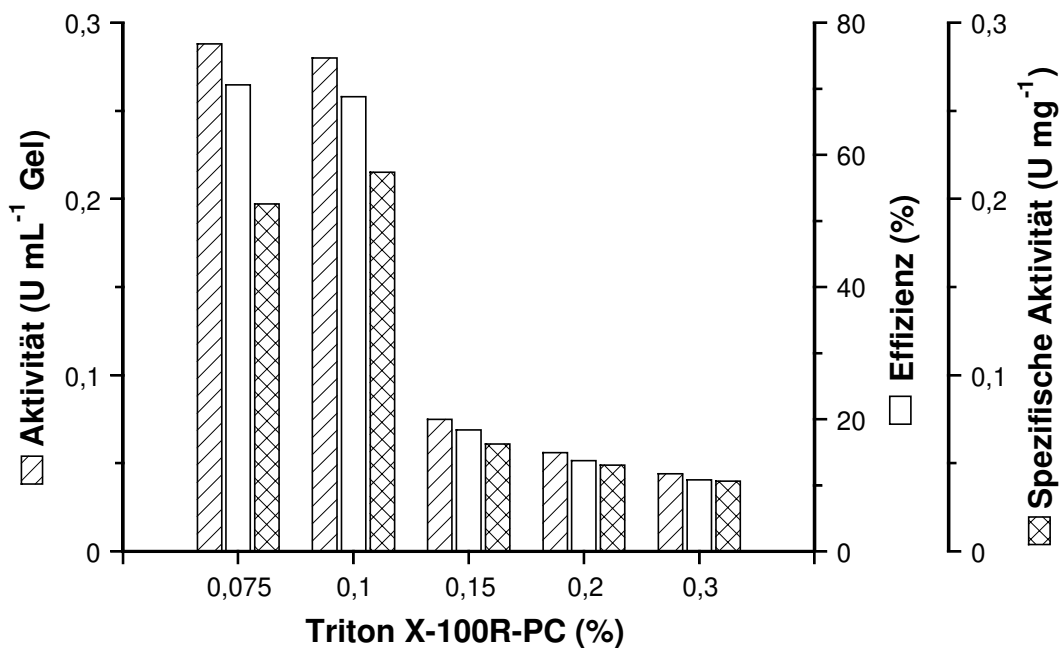
Abb. 2-42: Einfluß von Triton X-100R (0,1-1,0 %) auf die Aktivitätseffizienz.

Im Gegensatz zu der Aktivitätseffizienz ließ sich hinsichtlich der Kupplungseffizienz kein so ausgeprägter Einfluß des Detergenz feststellen (Tab. 2-13). Zwar wurde bei 0,1 % Triton X-100R mit 69,6 % das Maximum der Kupplungseffizienz erreicht, aber eine Verdopplung der Detergenzkonzentration führte nicht zu einer so drastischen Abnahme der Proteinkupplung (56,3 %), wie dies für die Aktivität beobachtet werden konnte. Selbst bei 1,0 % Triton X-100R wurden noch ca. 38 % des Proteins immobilisiert.

Tab. 2-13: Einfluß von Triton X-100R auf die Kupplungseffizienz.

Triton X-100R (%)	Protein (mg mL ⁻¹ Gel)	Kupplungseffizienz (%)
0,1	1,96	69,6
0,2	1,59	56,3
0,3	1,38	49,1
0,5	1,33	47,1
1,0	1,07	37,9

Offensichtlich gab es eine bestimmte Detergenzkonzentration, ab der sich die Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase stark verschlechterte. Um diesen Bereich näher einzugrenzen, wurde die Detergenzkonzentration von 0,075 % bis 0,3 % variiert. In diesem Experiment wurde Triton X-100R durch Triton X-100R-PC ersetzt, das sich durch eine höhere Reinheit (Peroxid- und Carbonyl-frei) auszeichnete. Auf diese Weise sollte eine Inhibierung der Lyase durch im Detergenz enthaltene Verunreinigungen möglichst ausgeschlossen werden. Die Immobilisierung wurde mit 250 µL Gel, 200 µL Solubilisat (0,509 U mL⁻¹, Protein: 2,17 mg mL⁻¹) in einem Puffervolumen von insgesamt 0,8 mL ausgeführt (vgl. 4.7.2.).

**Abb. 2-43: Einfluß von Triton X-100R-PC (0,075-0,3 %) auf die Aktivitätseffizienz.**

Auch in diesem Experiment war die Aktivitätseffizienz bei niedrigen Detergenzkonzentrationen am größten, wobei sich das Maximum (70,6 %) bei 0,075 % Triton X-100R-

PC befand. Bereits eine Erhöhung auf 0,15 % Triton X-100R-PC verursachte eine Abnahme der Aktivitätseffizienz auf 18,4 %. Im untersuchten Konzentrationsbereich wurde eine maximale Kupplungseffizienz von 84,2 % bei 0,075 % Triton X-100R-PC erreicht, die sich mit zunehmender Konzentration kontinuierlich verringerte (Tab. 2-14).

Tab. 2-14: Einfluß von Triton X-100R-PC auf die Kupplungseffizienz.

Triton X-100R-PC (%)	Protein (mg mL ⁻¹ Gel)	Kupplungseffizienz (%)
0,075	1,46	84,2
0,10	1,30	74,5
0,15	1,22	69,9
0,20	1,15	66,1
0,30	1,09	62,6

2.9.3. Operationsstabilität immobilisierter Hydroperoxid-Lyase

2.9.3.1. Substratkonzentration

Um die Operationsstabilität, d. h. die Stabilität unter Bedingungen des wiederholten Einsatzes, der Immobilisate zu untersuchen, wurde die Hydroperoxid-Lyase im Makro-Ansatz (vgl. 4.7.3.) immobilisiert und nach Aliquotierung des Gels (200 µL) bei Substratkonzentrationen von 55-1234 µM 13-HPOD (= 1,65-24,68 µmol mL⁻¹ Gel) mehrmals direkt hintereinander inkubiert (vgl. 4.8.2.1.). Im Gegensatz zum Konzentrationsbereich von 411-1148 µM 13-HPOD erfolgte aus organisatorischen Gründen die Inkubation der Immobilisate mit 55-411 µM 13-HPOD einen Tag später.

Die Wiederverwendbarkeit der Immobilisate lag bei wenigen Zyklen, wobei in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ein unterschiedlich stark ausgeprägter Aktivitätsverlust auftrat. Das mit 411 µM 13-HPOD inkubierte Immobilisat wies mit 0,95 U mL⁻¹ Gel die größte Anfangsaktivität auf, während bei höheren Substratkonzentrationen die Aktivität deutlich vermindert war (0,74 bzw. 0,48 U mL⁻¹ Gel) (Abb. 2-44). Im Verlauf von drei weiteren Zyklen sank die Aktivität aller Immobilisate auf ca. 0,08-0,18 U mL⁻¹ Gel ab. Bemerkenswert war, daß während der 3-minütigen Inkubation die insgesamt gebildete Menge an Hexanal bei einer Substratkonzentration von 411 µM mit 555 µg mL⁻¹ Gel wesentlich größer war als bei den höheren Substratkonzentrationen 823 µM (435 µg mL⁻¹ Gel Hexanal) und 1148 µM (321 µg mL⁻¹ Gel Hexanal).

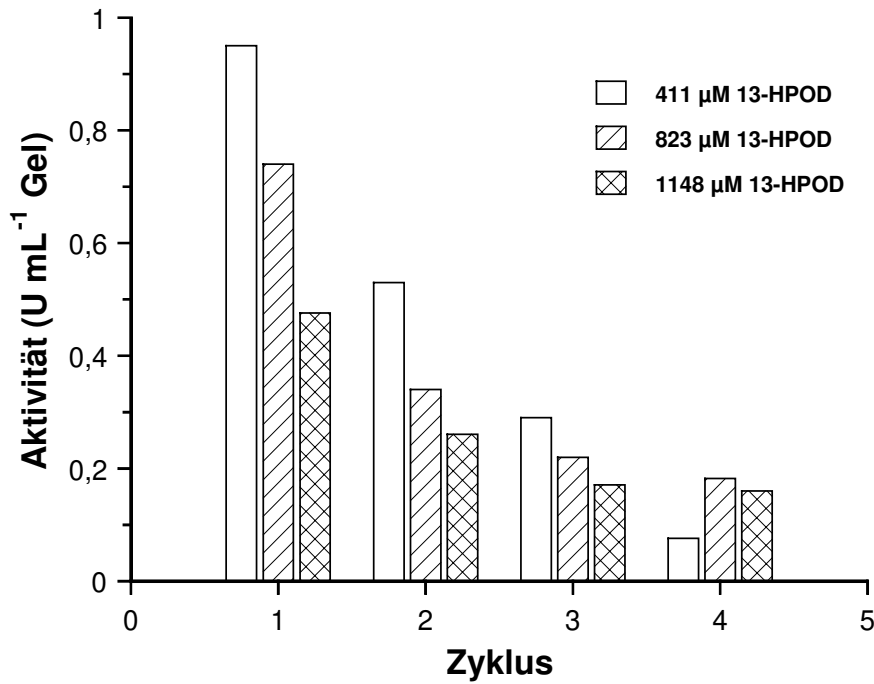


Abb. 2-44: Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (411-1148 μM).

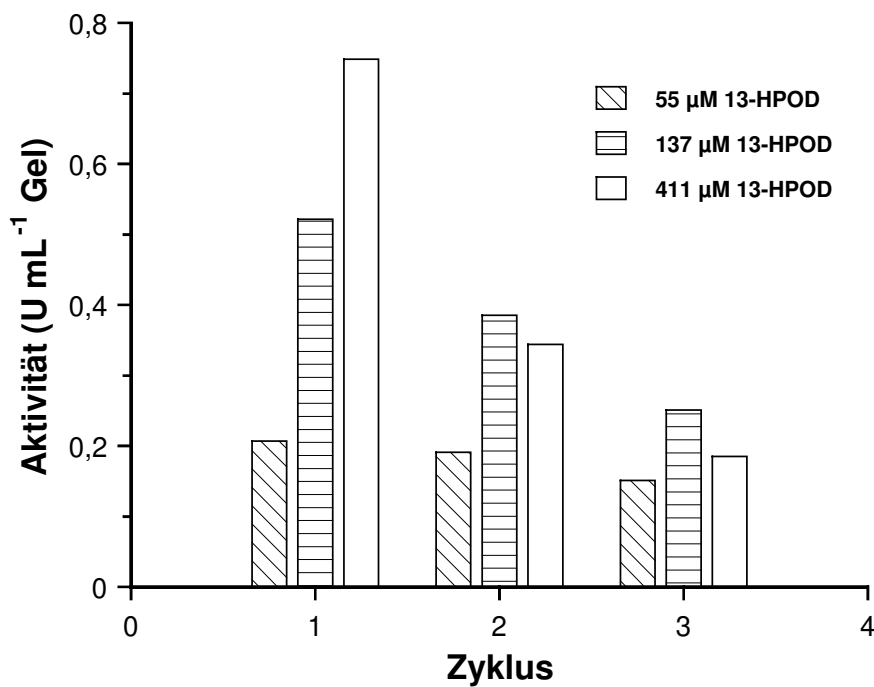


Abb. 2-45: Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (55-411 μM).

Eine Verringerung der Substratkonzentration führte beim 1. Zyklus zu einer starken Reduktion der Anfangsaktivität, die von 0,75 (411 μM 13-HPOD) bis auf 0,21 $\text{U mL}^{-1} \text{ Gel}$ (55 μM 13-HPOD) zurückging (Abb. 2-45). Unter diesen Bedingungen der Sub-

stratarmut war vermutlich die Diffusion von 13-HPOD zum aktiven Zentrum der Lyase der limitierende Faktor der Reaktion.

Um den Aktivitätsverlust der Immobilisate anschaulich darstellen zu können, wurde die relative Aktivität berechnet, indem die Anfangsaktivität (1. Zyklus) des jeweiligen Immobilisates 100 % gleichgesetzt wurde (Tab. 2-15). Der größte Aktivitätsverlust ereignete sich bei höheren Substratkonzentrationen (411-1148 μM). Hier waren beispielsweise beim 2. Zyklus noch 39,9-55,8 % der Anfangsaktivität und beim 3. Zyklus nur noch 29,7-30,5 % vorhanden. Im Gegensatz dazu wurde bei der geringsten Substratkonzentration (55 μM) beim 2. Zyklus kaum Enzymaktivität eingebüßt (7,7 %) und selbst beim 3. Zyklus lagen noch 72,9 % der Anfangsaktivität vor. Die Aktivität der inaktivierten Gele konnte weder durch eine einstündige Inkubation mit Dithiothreitol noch Cystein (10 mM in 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer, pH 6,5) wiederhergestellt werden.

Tab. 2-15: Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

13-HPOD (μM)	13-HPOD ($\mu\text{mol mL}^{-1}$ Gel)	Relative Aktivität (%)			
		Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4
411	8,23	100	55,8	30,5	8,1
823	16,45	100	39,9	29,7	24,6
1234	24,68	100	54,9	35,8	33,6
55	1,65	100	92,3	72,9	n. b.
137	4,11	100	73,9	48,1	n. b.
441	8,23	100	46,0	24,7	n. b.

n. b.: nicht bestimmt

2.9.3.2. Antioxidantien

Ein Zusatz von Antioxidantien sollte einem Aktivitätsverlust des immobilisierten Enzyms durch möglicherweise während der Katalyse gebildete Radikale entgegenwirken. Als Antioxidantien wurden *tert*-Butyl-4-hydroxyanisol (BHA), 2,6-Di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluol (BHT) und Nordihydroguajaretsäure (NDGA) zunächst in einer verhältnismäßig geringen Konzentration von 0,05 mM eingesetzt, da bei höheren Konzentrationen eine

Inhibierung der Hydroperoxid-Lyase festgestellt worden war [27]. Die Inkubation der Immobilisate erfolgte mit 313 μM 13-HPOD (vgl. 4.8.2.1.).

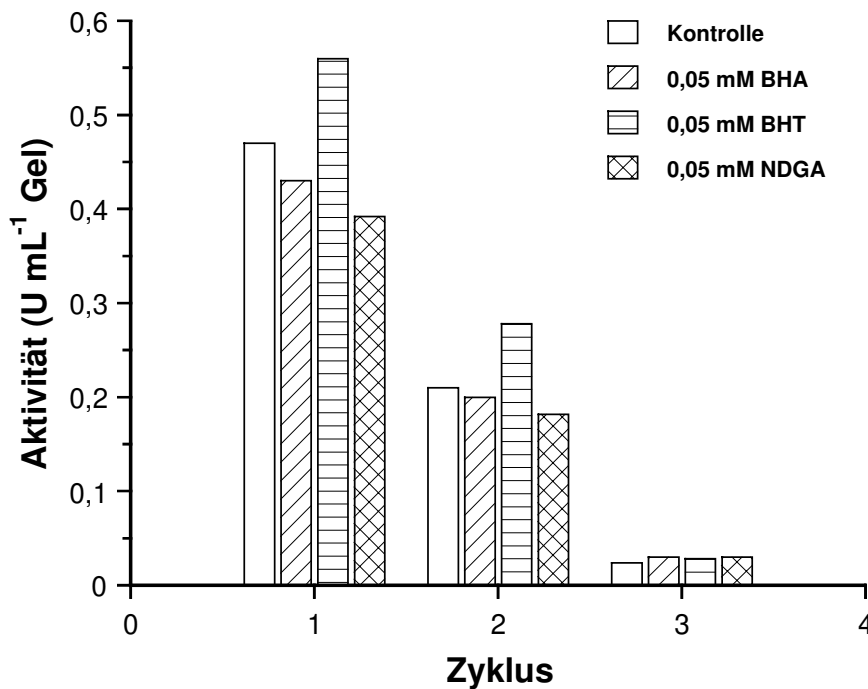


Abb. 2-46: Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Antioxidantien.

Mit Ausnahme des in Gegenwart von BHT inkubierten Immobilisates war die Anfangsaktivität der beiden anderen Immobilisate (BHA, NDGA) niedriger als die Kontrolle ohne Antioxidans (Abb. 2-46). Allerdings konnte durch die Antioxidantien der große Verlust an Aktivität während mehrfacher Inkubation nicht verhindert werden. Weder zwischen den einzelnen Antioxidantien noch im Vergleich zu der Kontrolle wurden signifikante Unterschiede in bezug auf die relativen Aktivitäten festgestellt (Tab. 2-16).

Tab. 2-16: Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Antioxidantien.

Probe	Relative Aktivität (%)		
	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3
Kontrolle	100	44,7	5,1
0,05 mM BHA	100	46,5	7,0
0,05 mM BHT	100	49,6	5,0
0,05 mM NDGA	100	46,4	7,7

Im Fall von NDGA wurde das Experiment mit einer Konzentration von 0,5 mM wiederholt, wobei sich im Vergleich zur Kontrolle eine um 46,7 % verminderte Anfangsaktivität beim 1. Zyklus ergab. Somit konnte der bei höheren Konzentrationen auftretende inhibierende Effekt von Antioxidantien bestätigt werden.

2.9.3.3. Eisen

Die Hydroperoxid-Lyase ist ein Cytochrom P450 Enzym, das als prosthetische Gruppe Häm *b* besitzt [28]. Da ein Verlust des Zentralatoms Eisen aus dem Häm *b* eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge haben konnte, wurde das Immobilisat mit 313 μM 13-HPOD in einem Puffer inkubiert (vgl. 4.8.2.1.), der 20 mM Eisen(II) bzw. Eisen(III) enthielt.

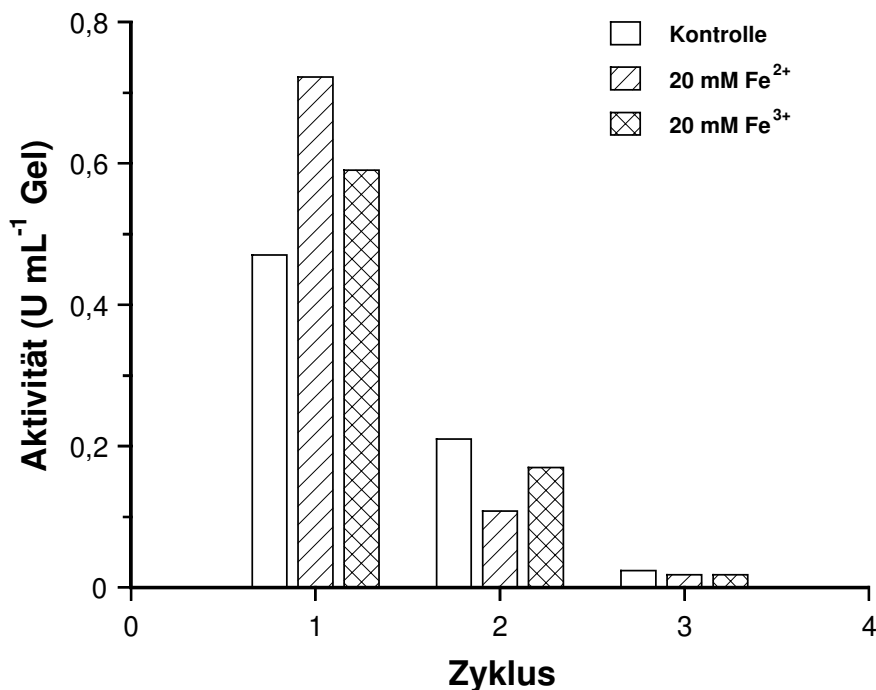


Abb. 2-47: Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Eisen(II) und Eisen(III).

Während des 1. Zyklus lagen die Aktivitäten der in Fe^{2+/3+}-haltigem Puffer inkubierten Immobilisate mit 0,72 U mL⁻¹ Gel (Fe²⁺) bzw. 0,59 U mL⁻¹ Gel (Fe³⁺) deutlich über dem Wert der Kontrolle von 0,47 U mL⁻¹ Gel (Abb. 2-47). Allerdings fand auch in diesem Experiment bereits ab dem 2. Zyklus bei allen Immobilisaten eine beträchtliche Verringerung der Aktivität statt (0,18-0,23 U mL⁻¹), wobei die Kontrolle den beiden anderen Immobilisaten an Aktivität überlegen war. Der Verlauf der relativen Aktivität veran-

schaulichte nochmals, daß in Gegenwart von Eisenionen der Aktivitätsverlust stärker ausgeprägt war als bei der Kontrolle (Tab. 2-17).

Tab. 2-17: Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Eisen(II) und Eisen(III).

Probe	Relative Aktivität (%)		
	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3
Kontrolle	100	44,7	5,1
20 mM Fe ²⁺	100	15,0	2,5
20 mM Fe ³⁺	100	28,8	3,1

2.9.3.4. Sorbitol

Polyole werden häufig eingesetzt, um Membranenzyme vor einem Aktivitätsverlust bei der Solubilisierung oder bei der Lagerung zu schützen [29]. Als Polyol wurde dem Inkubationspuffer (400 µM 13-HPOD) Sorbitol in einer Konzentration von 10 % und 20 % (w/v) zugesetzt.

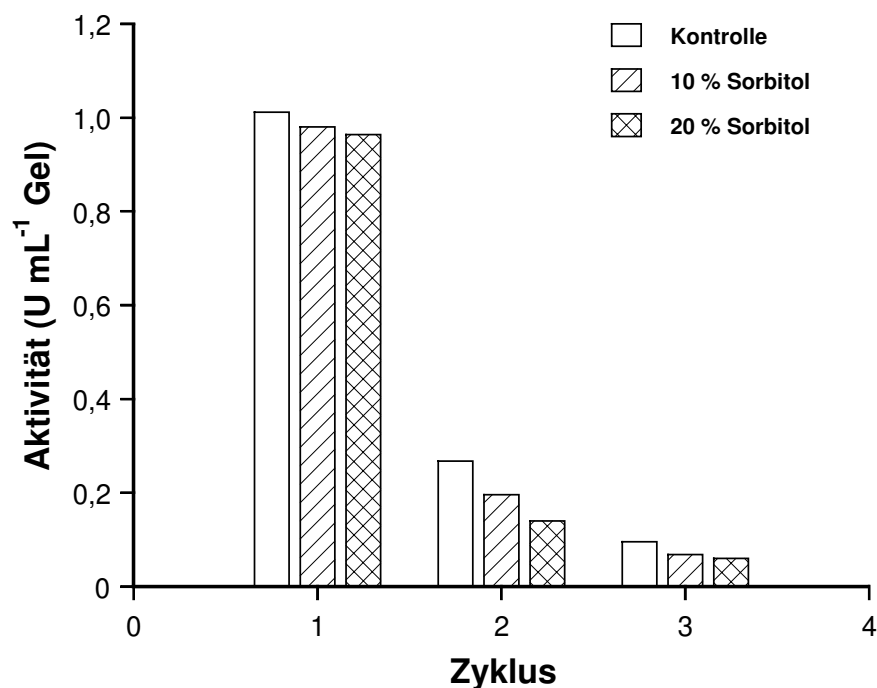


Abb. 2-48: Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Sorbitol.

Auch in diesem Versuch war der Aktivitätsverlust des Immobilisates nach nur einer Inkubation enorm hoch (Abb. 2-48). Sorbitol führte im Vergleich zu der Kontrolle bei jedem Zyklus zu einer leicht erniedrigten Aktivität und besaß somit keine stabilisierende Wirkung. Tab. 2-18 zeigt die relativen Aktivitäten.

Tab. 2-18: Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Sorbitol.

Probe	Relative Aktivität (%)		
	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3
Kontrolle	100	27,4	9,5
10 % Sorbitol	100	20,0	6,9
20 % Sorbitol	100	14,5	6,2

2.9.3.5. Thiole

Um die reduzierte Form von Sulfhydrylgruppen aufrecht zu erhalten, die sich unter Umständen in dem aktiven Zentrum der Hydroperoxid-Lyase befanden, wurde die Inkubation mit 13-HPOD (415 μM) in Gegenwart verschiedener Thiole durchgeführt (vgl. 4.8.2.1.). Dithiothreitol (DTT), Cystein (Cys) und Glutathion (GSH) wurden in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt.

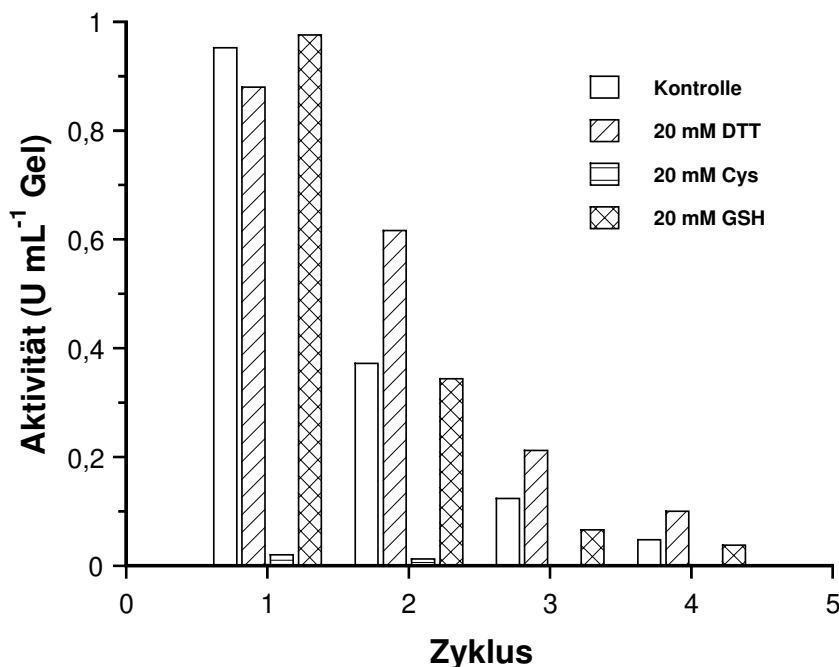


Abb. 2-49: Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Thiolen.

Die Anfangsaktivitäten der Kontrolle (ohne Thiol) und der in Anwesenheit von Dithiothreitol und Glutathion inkubierten Immobilisate waren mit $0,88-0,98 \text{ U mL}^{-1}$ Gel relativ ähnlich (Abb. 2-49). Im Gegensatz dazu verursachte Cystein schon während des 1. Zyklus einen nahezu vollständigen Aktivitätsverlust des Immobilisates ($0,02 \text{ U mL}^{-1}$ Gel). Im Verlauf weiterer Zyklen konnte mit Dithiothreitol erstmals ein positiver Effekt auf die Enzymaktivität festgestellt werden, da diese jeweils über dem Wert der Kontrolle lag. Glutathion ergab dagegen im Vergleich zur Kontrolle eine geringfügig erniedrigte Aktivität.

Das Ausmaß des positiven Effektes von Dithiothreitol wurde besonders bei Betrachtung der relativen Aktivität deutlich, die während der Zyklen 2-4 um den Faktor 1,8-2,3 höher war als die der Kontrolle (Tab. 2-19). Um Mißverständnisse bei einem Vergleich der Immobilisate untereinander zu vermeiden, muß bei der Beurteilung der hohen relativen Aktivität des in Gegenwart von Cystein inkubierten Immobilisates (61,1 %, 2. Zyklus) beachtet werden, daß die Anfangsaktivität äußerst gering war.

Tab. 2-19: Wiederverwendbarkeit immobilisierter Hydroperoxid-Lyase in Gegenwart von Thiolen.

Probe	Relative Aktivität (%)			
	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4
Kontrolle	100	39,1	13,0	5,0
20 mM DTT	100	70,0	24,1	11,4
20 mM Cys	100	61,1	0	0
20 mM GSH	100	35,2	6,8	3,9

2.9.4. Temperaturstabilität der Hydroperoxid-Lyase

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität der Hydroperoxid-Lyase wurden die Immobilisate (vgl. 4.7.2.) bzw. Solubilisate (vgl. 4.6.4.) bei pH 7 unterschiedlichen Temperaturen 0,5 h ausgesetzt.

Mit ansteigender Temperatur erfolgte ein zunehmender Aktivitätsverlust sowohl des Solubilisates als auch des Immobilisates, wobei sich dieser bei ersterem in verstärktem Maß ereignete (Abb. 2-50). Bis zu einer Temperatur von 40 °C waren bei beiden noch über 80 % der Anfangsaktivität vorhanden, danach setzte bei dem Solubilisat ein

schnellerer Aktivitätsverlust als bei dem Immobilisat ein. So besaß das Immobilisat bei 60 °C noch 46 % der anfänglichen Aktivität, das Solubilisat dagegen nur 24 %.

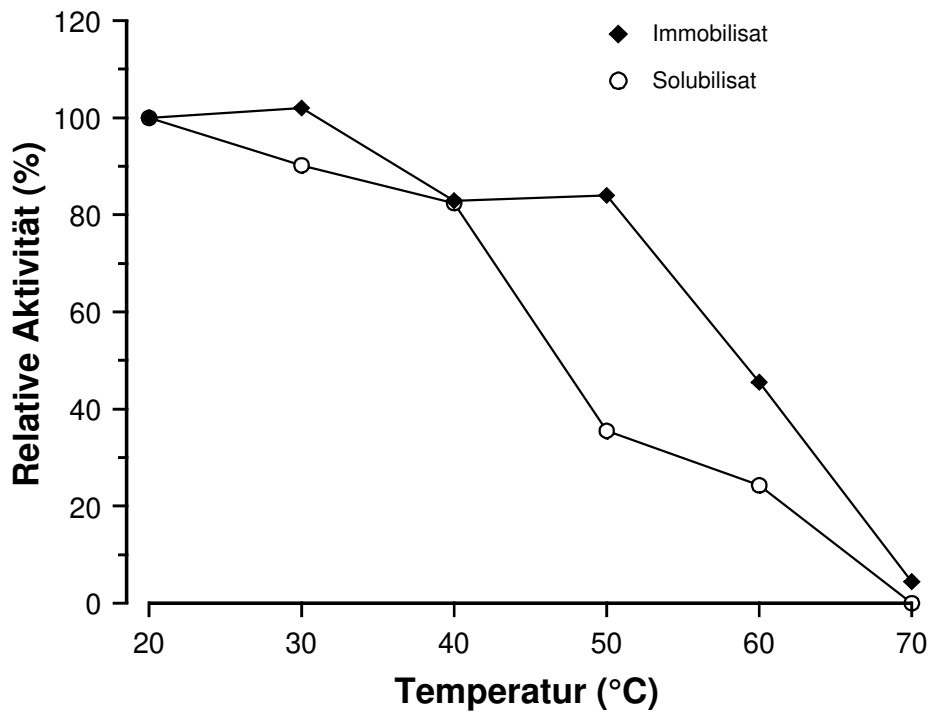


Abb. 2-50: Stabilität der Hydroperoxid-Lyase nach 0,5 h Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen (I).

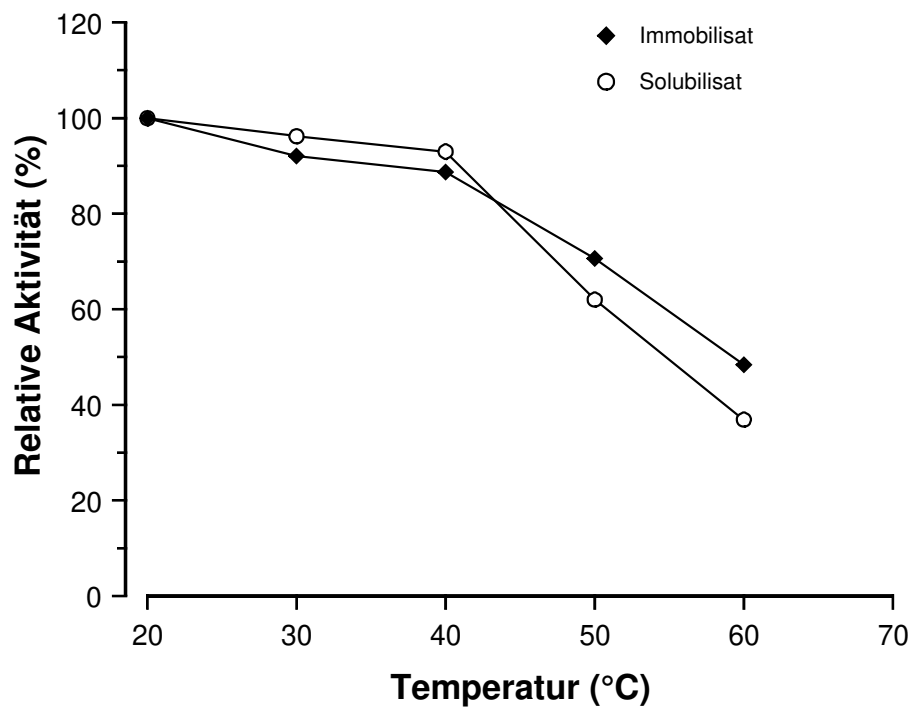


Abb. 2-51: Stabilität der Hydroperoxid-Lyase nach 0,5 h Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen (II).

Allerdings konnte trotz mehrfacher Wiederholung des Experimentes kein einheitliches Bild für die Temperaturstabilität erhalten werden, was insbesondere für die Inaktivierung des Solubilisates galt (Abb. 2-51). Im Gegensatz zum vorangegangenen Experiment erwies sich das Solubilisat in einem Temperaturbereich von 20-40 °C stabiler als die immobilisierte Lyase, ab einer Temperatur von 40 °C war dagegen das Immobilisat dem Solubilisat leicht überlegen.

2.9.5. Lagerstabilität immobilisierter Hydroperoxid-Lyase

Zur Untersuchung der Lagerstabilität wurde die Hydroperoxid-Lyase im Makro-Ansatz (vgl. 4.7.3.) immobilisiert und für einen Zeitraum von 18 d bei pH 7 und einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt. In gewissen Zeitabständen wurde die Aktivität eines Aliquots mit der des unter gleichen Bedingungen gelagerten Solubilisates verglichen. Zur Konservierung wurde dem Puffer 0,01 % Natriumazid zugesetzt.

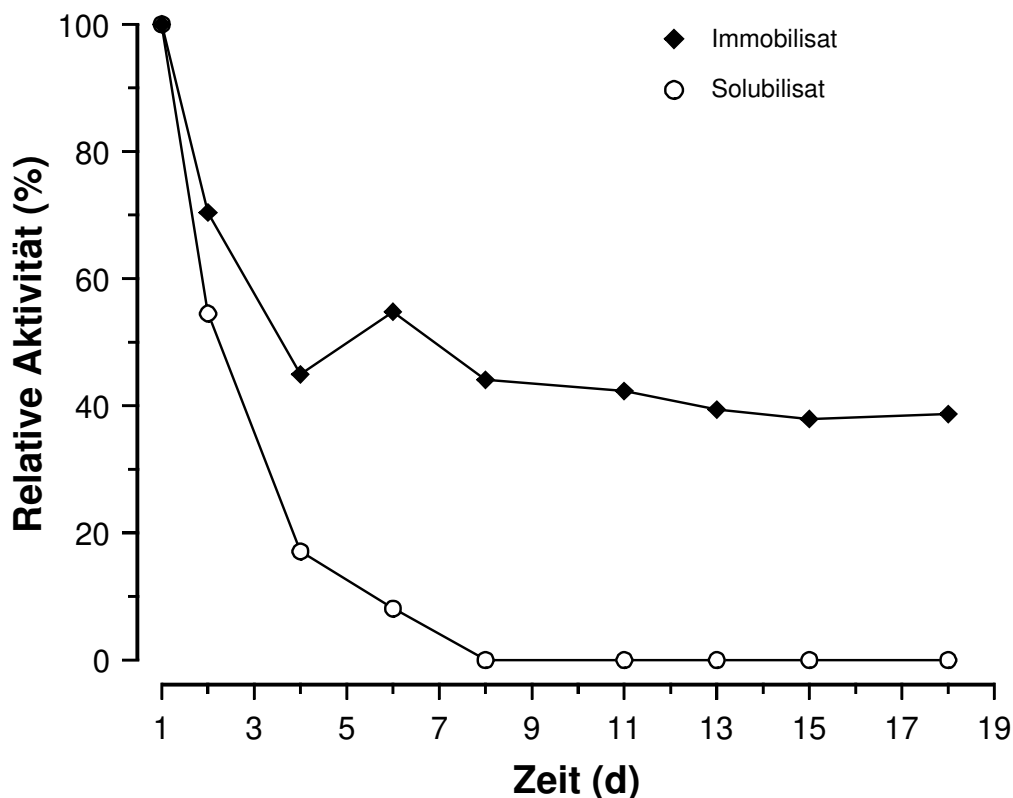


Abb. 2-52: Stabilität der Hydroperoxid-Lyase während der Lagerung bei 4 °C in Anwesenheit von 0,01 % Natriumazid .

Innerhalb der ersten vier Tage war sowohl bei dem Immobilisat als auch bei dem Solubilisat eine drastische Verminderung der Anfangsaktivität auf 45 % bzw. 17 % festzustellen (Abb. 2-52). Während das Solubilisat ab dem 8. Tag vollständig inaktiv war, blieb die Aktivität des Immobilisates bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes nahezu konstant bei ca. 40 %.

Dieses Resultat wich stark von dem in einem Vorversuch erhaltenen Aktivitätsverlauf ab. Hier konnte während einer 6-tägigen Lagerung des Immobilisates kein Aktivitätsverlust beobachtet werden. Die relative Aktivität des Solubilisates ging nur auf 58 % zurück. Der einzige Unterschied zwischen beiden Experimenten bestand darin, daß bei der 6-tägigen Lagerung auf einen Zusatz von Natriumazid verzichtet wurde.

Daher wurde das Experiment ohne einen Zusatz von Natriumazid wiederholt (Abb. 2-53). Im Gegensatz zu obigen Versuch (Abb. 2-52) lagen beim Solubilisat am 8. Tag noch 42 % der anfänglichen Aktivität vor, die sich im Verlauf der folgenden Tage auf 32 % verringerte. Das Immobilisat zeigte sich bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes von 18 d mit einer relativen Aktivität von 86 % äußerst stabil.

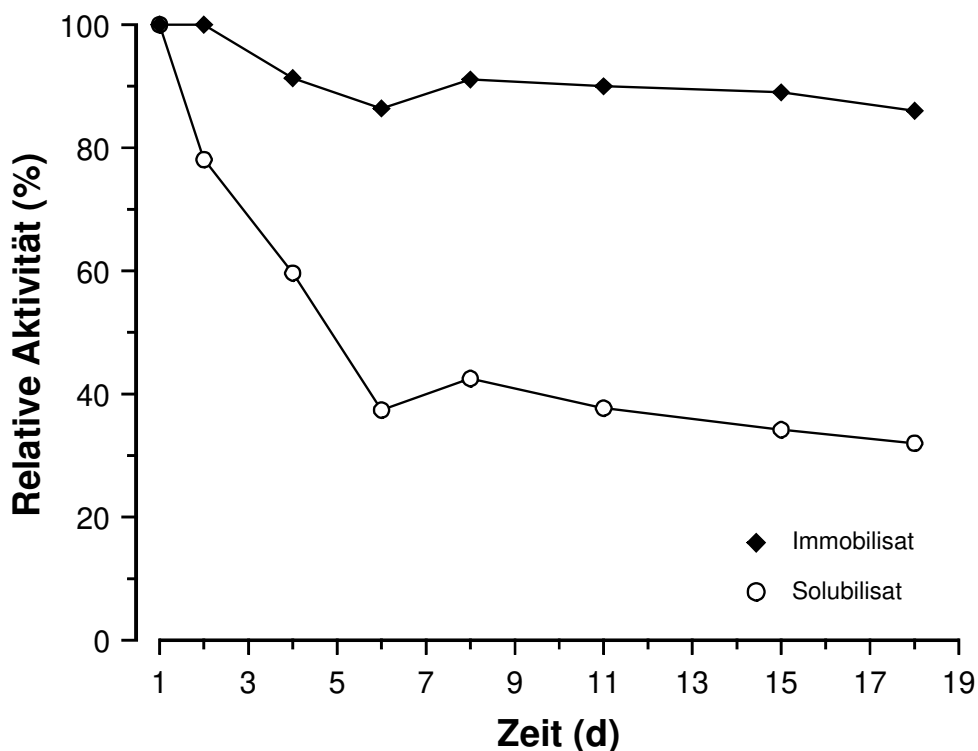


Abb. 2-53: *Stabilität der Hydroperoxid-Lyase während der Lagerung bei 4 °C ohne Natriumazid.*

2.9.6. Vergleich der Produktivität von Immobilisat und Solubilisat

Um die Produktivität des Immobilisates und der freien Hydroperoxid-Lyase (Solubilisat) zu ermitteln, wurden das Immobilisat und ein Solubilisatvolumen, das dem zur Immobilisierung eingesetzten äquivalent war, mit zwei unterschiedlichen Substratkonzentrationen von $7,65 \mu\text{mol mL}^{-1}$ Gel/Solubilisat ($355 \mu\text{M}$) bzw. $22,9 \mu\text{mol mL}^{-1}$ Gel/Solubilisat ($1.066 \mu\text{M}$) 13-HPOT inkubiert. In Abweichung zu dem bisherigen 3-minütigen Aktivitäts-Assay (vgl. 4.8.2.1.) erfolgte nun die Inkubation 15 min, um eine ausreichende Reaktionszeit zur Verfügung zu stellen. Da die Hydroperoxid-Lyase nicht vollständig immobilisiert worden war (Aktivitätseffizienz 77,4 %), wurden die für das Solubilisat erhaltenen Produktmengen auf diesen Wert normiert. Dies erlaubte einen direkten Vergleich der Produktivität von Immobilisat und Solubilisat. Während das Immobilisat nacheinander dreimal mit 13-HPOT inkubiert wurde, war eine dreifache Substratzugabe bei dem Solubilisat nicht möglich, da sonst der Methanolgehalt (methanolische Substratlösung) auf über 18 % angestiegen wäre.

Die vom Immobilisat während des 1. Zyklus gebildeten Konzentrationen an 3Z- und 2E-Hexenal (Summe) waren bei beiden Substratkonzentrationen mit 136 bzw. 271 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Gel/Solubilisat um 9-14 % höher als die des Solubilisates (Tab. 2-20). Bei dem 2. Zyklus des Immobilisates wurde, vor allem bei der höheren Substratkonzentration, eine deutliche Verschlechterung des Umsatzes festgestellt. Im Gegensatz zu früheren Versuchen (vgl. 2.4., 2.5.) stellte nicht 2E- sondern 3Z-Hexenal das Hauptprodukt dar. Dies deutete darauf hin, daß entweder die 3Z,2E-Enal-Isomerase zu den löslichen Enzymen zählte, die bei der Aufarbeitung mit dem Überstand 1 (vgl. Abb. 2-24) verworfen wurden, oder daß sie durch das Detergenz in dem Solubilisat gehemmt wurde.

Tab. 2-20: Vergleich der Produktivität von Immobilisat und Solubilisat.

13-HPOT (μM)	Zyklus	Immobilisat ($\mu\text{g mL}^{-1}$ Gel)		Solubilisat ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
		3Z-Hexenal	2E-Hexenal	3Z-Hexenal	2E-Hexenal
355	1	125	11	75	44
	2	65	7	n. b.	n. b.
	3	5	-	n. b.	n. b.
1.066	1	247	24	194	54
	2	6	2	n. b.	n. b.
	3	-	-	n. b.	n. b.

n. b.: nicht bestimmt

Unter Berücksichtigung, daß nur 200 µL von insgesamt 7 mL Solubilisat, das aus 40 g Keimlingen hergestellt war, zur Immobilisierung (200 µL Gel) herangezogen wurden, und unter Bezug der Werte auf 1 kg Pflanzenmaterial ergeben sich rechnerisch größere Produktmengen, die jedoch bei weitem nicht an die mit Homogenaten oder Rohextrakten erzielten maximalen Konzentrationen heranreichten (Tab. 2-21).

Tab. 2-21: Vergleich der Produktivität von Immobilisat und Solubilisat bezogen auf 1 kg Keimlinge.

13-HPOT (µM)	Σ Zyklus	Immobilisat (mg kg ⁻¹)		Solubilisat (mg kg ⁻¹)	
		3Z-Hexenal	2E-Hexenal	3Z-Hexenal	2E-Hexenal
355	1-3	34,0	3,2	13,1	7,7
1.066	1-2	44,3	4,6	34,0	9,5

2.10. GC-MS-Analytik nichtflüchtiger Metabolite

2.10.1. GC-MS-Analytik nach Methylierung

In den unter 2.4. und 2.5. beschriebenen Experimenten betrug die molare Umsatzrate von 13-HPOT zu 2E-Hexenal 40-50 %. Während der GC-MS-Analytik auf einer polaren Säule (Carbowax 20 M) traten außer den bisher genannten C₆-Verbindungen keine weiteren Peaks auf. Es sollte daher ermittelt werden, ob nach Methylierung der organischen Extrakte eventuell nichtflüchtige Nebenprodukte detektiert werden konnten (vgl. 4.3.1.).

Hierzu wurden unter Verwendung von 0,1 % Triton X-100 hergestellte Rohextrakte (vgl. 4.6.3.) mit 12 mmol kg⁻¹ 13-HPOT 1 h bei pH 6,5 inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde bei pH 4,0 extrahiert, methyliert und mittels GC-MS auf einer unpolaren Säule (SE 54) untersucht (vgl. 4.2.2.).

Im Vergleich zu dem Blindwert (Rohextrakt ohne 13-HPOT) zeigte das Chromatogramm der mit 13-HPOT inkubierten Probe einige zusätzliche Peaks (Abb. 2-54). Bei den nachfolgend aufgeführten Peaks handelte es sich um die Methylester endogener Fettsäuren: 59,9 min: Palmitinsäuremethylester, 65,3 min: Linolsäuremethylester, 65,6 min: Linolensäuremethylester, 66,2 min: Stearinsäuremethylester.

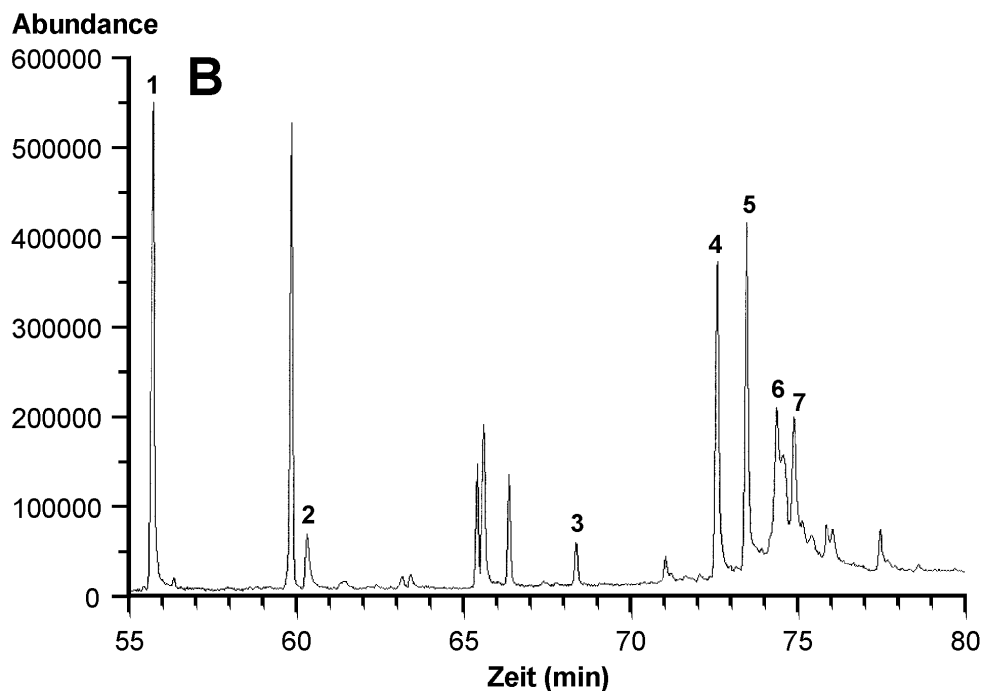
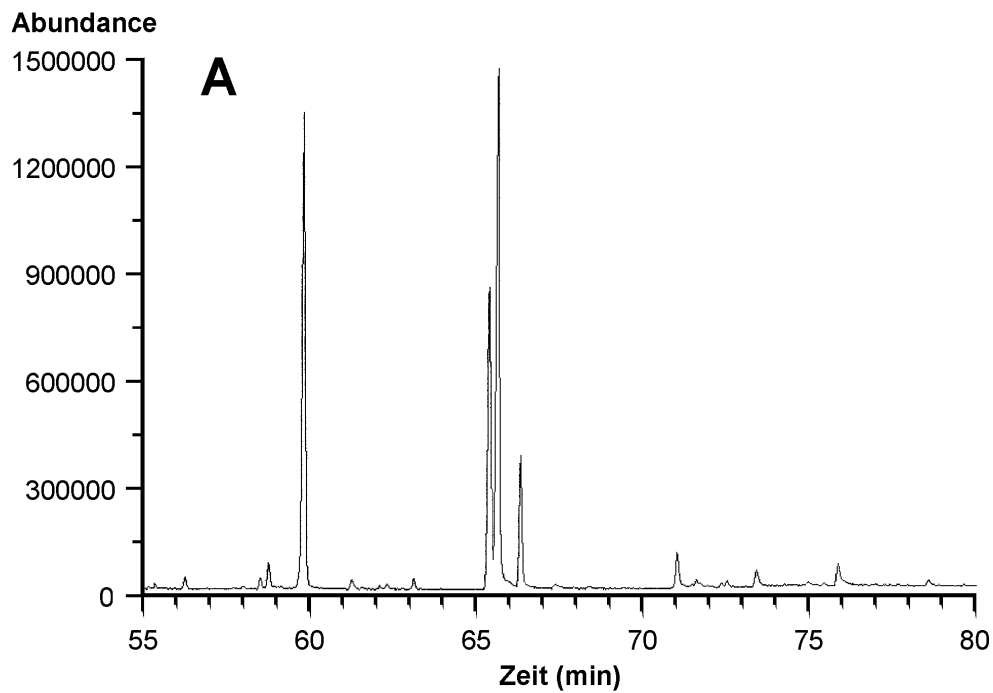


Abb. 2-54: GC-Chromatogramm nichtflüchtiger Metabolite (Methylester).
 A: Blindwert, B: Rohextrakt + 13-HPOT.

Peak 1 wurde als 12-Oxo-10*E*-dodecensäuremethylester identifiziert. Das erhaltene Massenspektrum (Abb. 2-55) stimmte mit dem von OLIAS et al. überein [30]. Das Molekülion m/z 226 wurde nicht detektiert. Fragmentationen befanden sich unter anderem bei m/z 194 ($[M - CH_3OH]^+$), 166 ($[M - CH_3OH - CO]^+$), 83 ($[M - (CH_2)_6COOCH_3]^+$), 74 ($[H_2C=COH-OCH_3]^+$, Mc Lafferty Umlagerung), 69 ($[M - (CH_2)_7COOCH_3]^+$), 59 ($[CO-OCH_3]^+$), 55 ($[m/z\ 83 - CO]^+$) und 41 ($[m/z\ 69 - CO]^+$).

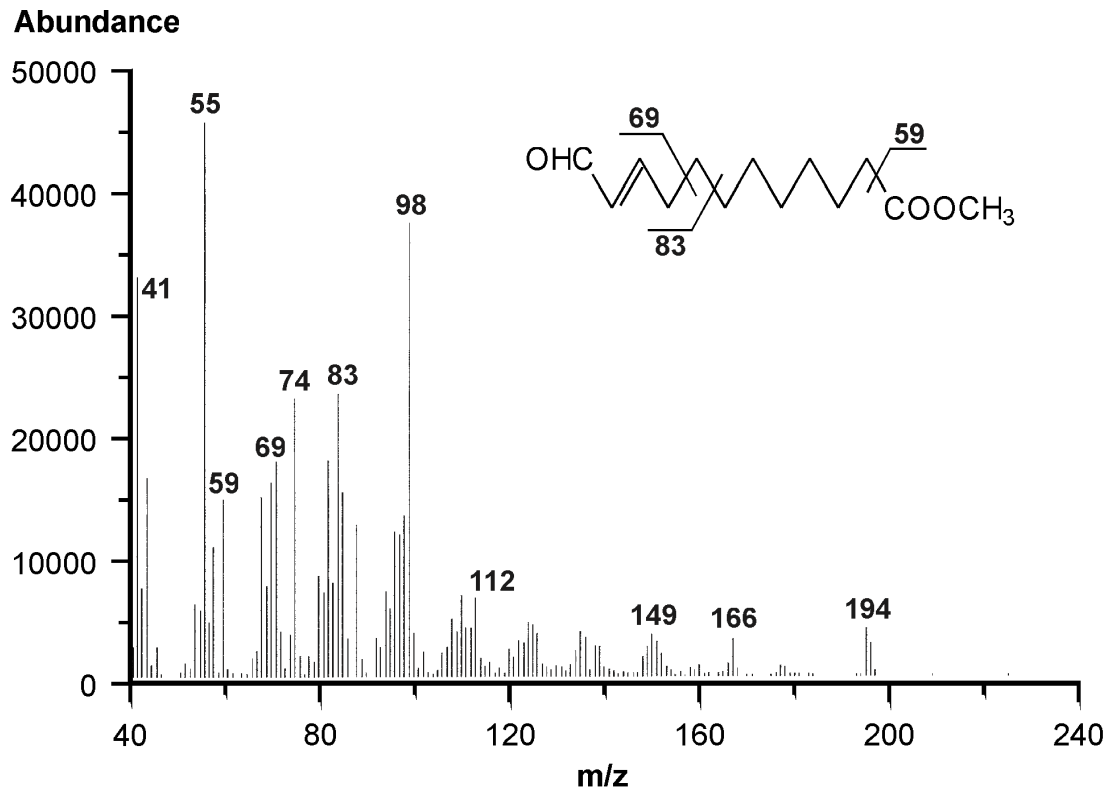


Abb. 2-55: GC-Massenspektrum (EI) von Peak 1: 12-Oxo-10E-dodecensäure (Me).

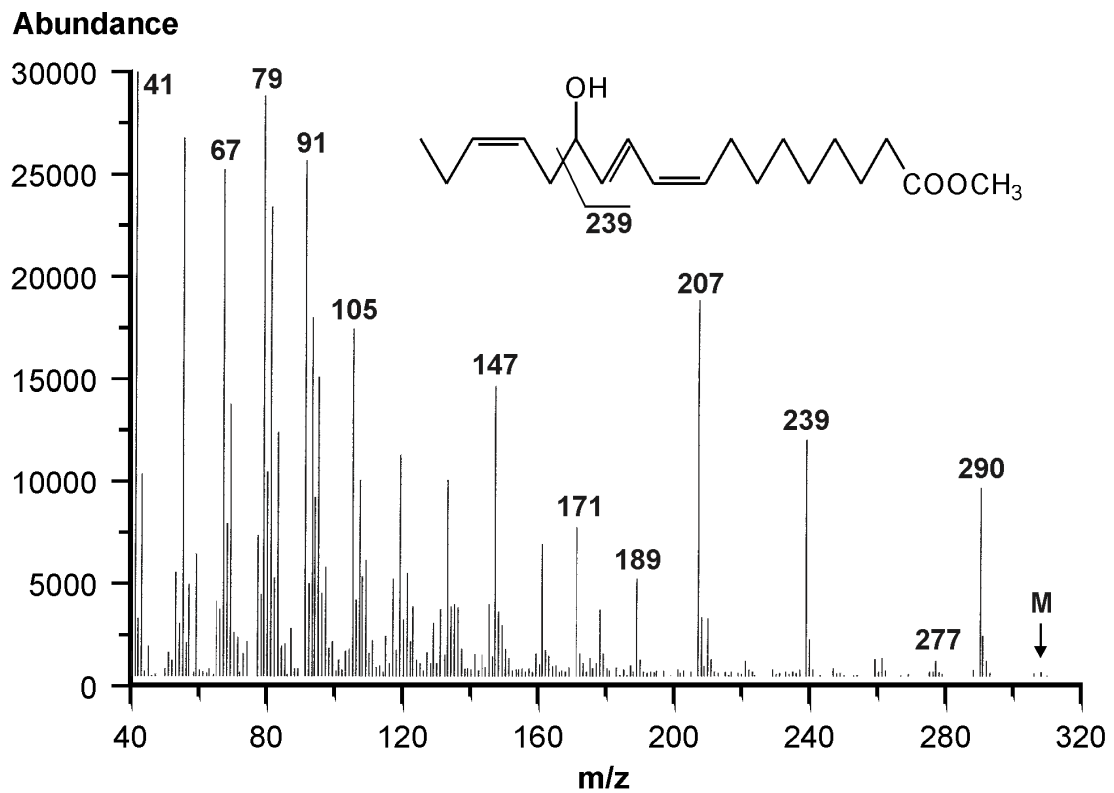


Abb. 2-56: GC-Massenspektrum (EI) von Peak 4: 13-HOT (Me).

Eine Identifizierung von **Peak 2** und **Peak 3** war nicht möglich.

Bei **Peak 4** handelte es sich um den Mylester der 13-Hydroxy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure (13-HOT). Aufgrund der ausgeprägten Tendenz zur Abspaltung von Wasser (m/z 290, $[M - H_2O]^+$) war die Intensität des Moleküliions (m/z 308) nur sehr gering (Abb. 2-56). Das Spektrum wies weitere charakteristische Fragmentationen bei m/z 277 ($[M - CH_3O]^+$), 239 ($[M - CH_3CH_2CH=CHCH_2]^+$), 207 ($[m/z$ 239 - $CH_3OH]^+$) und 189 ($[m/z$ 207 - $H_2O]^+$) auf.

Abb. 2-57 zeigt das Massenspektrum von **Peak 5**, der als Mylester der 12-Oxophytodiensäure (12-oxo-PDA) identifiziert wurde. Das Moleküliion wurde bei m/z 306 detektiert. Neben den charakteristischen Fragmentationen m/z 149 und m/z 238, die durch Abspaltung der Alkyl-Seitenketten entstanden, traten m/z 275 ($[M - CH_3O]^+$), 206 ($[m/z$ 238 - $CH_3OH]^+$), und m/z 95 ($[C_5H_4O \cdot CH_2 + H]^+$) auf. Das Fragmentierungsmuster war mit ZIMMERMAN und FENG in Übereinstimmung [31].

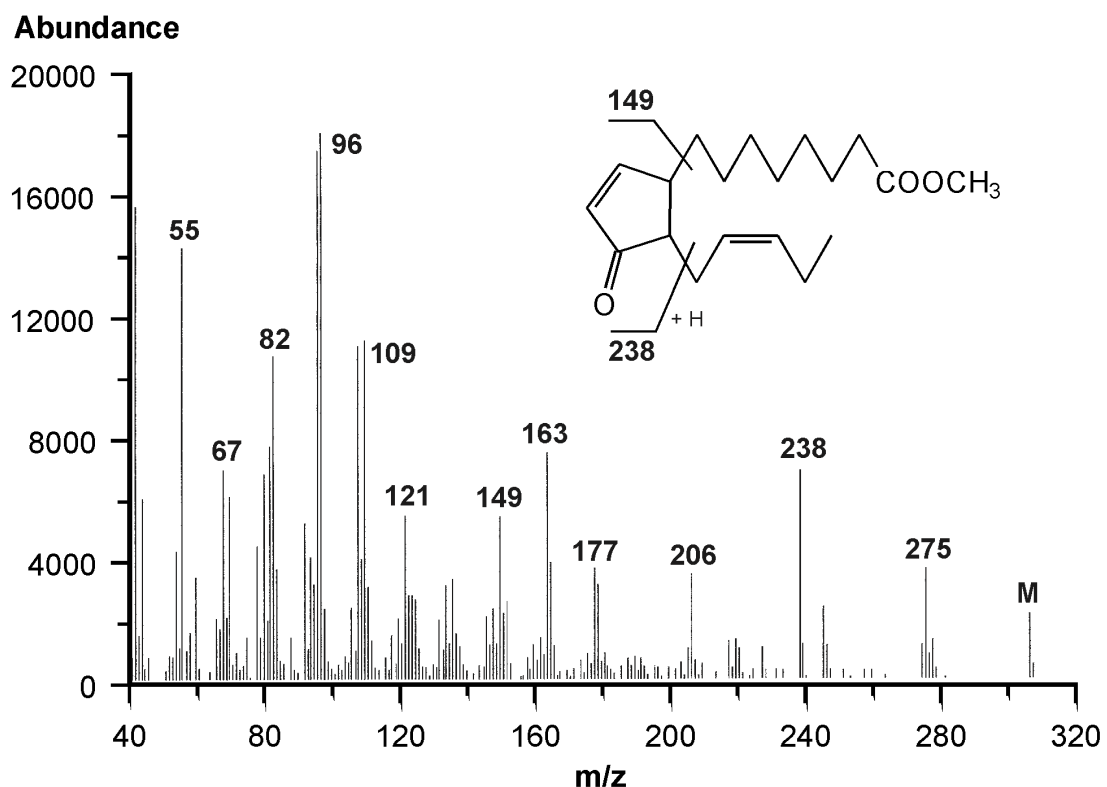


Abb. 2-57: GC-Massenspektrum (EI) von Peak 5: 12-oxo-PDA (Me).

Bei **Peak 6** handelte es sich um den Methylester der 12-Oxo-13-hydroxy-9Z,15Z-octadecadiensäure (12,13- α -Ketol) (Abb. 2-58). Abspaltung von Wasser und Methanol führte zu den Ionen m/z 306 ($[M - H_2O]^+$), 293 ($[M - CH_3O]^+$), 275 ($[M - H_2O - CH_3O]^+$) und 195 ($[m/z 227 - CH_3OH]^+$). Die Fragmentationen m/z 227 ($[M - CH_3CH_2CH=CHCH_2CHOH + 2 H]^+$) und 109 ($[M - CH_2CH=CH(CH_2)_7COOCH_3 - H_2O]^+$) resultierten aus der α -Spaltung am C_{12} . Das Molekülion m/z 324 konnte nur mit sehr geringer Intensität detektiert werden.

Die Fragmentationen bei m/z 227 und m/z 97 wichen jeweils um 2 Einheiten von denen der aufgrund der α -Spaltung erwarteten Ionen m/z 225 bzw. 99 ab. Die gleiche Beobachtung konnte in dem von GARDNER überlassenen Spektrum von 12-Oxo-13-hydroxy-9Z-octadecensäuremethylester (eine Doppelbindung weniger) gemacht werden. Möglicherweise war die Abweichung um 2 Masseneinheiten von den erwarteten Fragmenten durch Keto-Enol-Tautomerie verursacht, die zu einer Vertauschung der Keto- und Hydroxylgruppe führte [32]. Die Fragmentierung stimmte ebenfalls mit der von CROMBIE und MORGAN beschriebenen überein [33]. Die Schulter von Peak 6 zeigte ein fast identisches Spektrum, was vermutlich darauf zurückzuführen war, daß sich der Methylester des 12,13- α -Ketols und auch das TMS-Derivat während der GC-Analytik in mehrere Peaks umlagern, die zum Teil ähnliche Spektren ergeben [34].

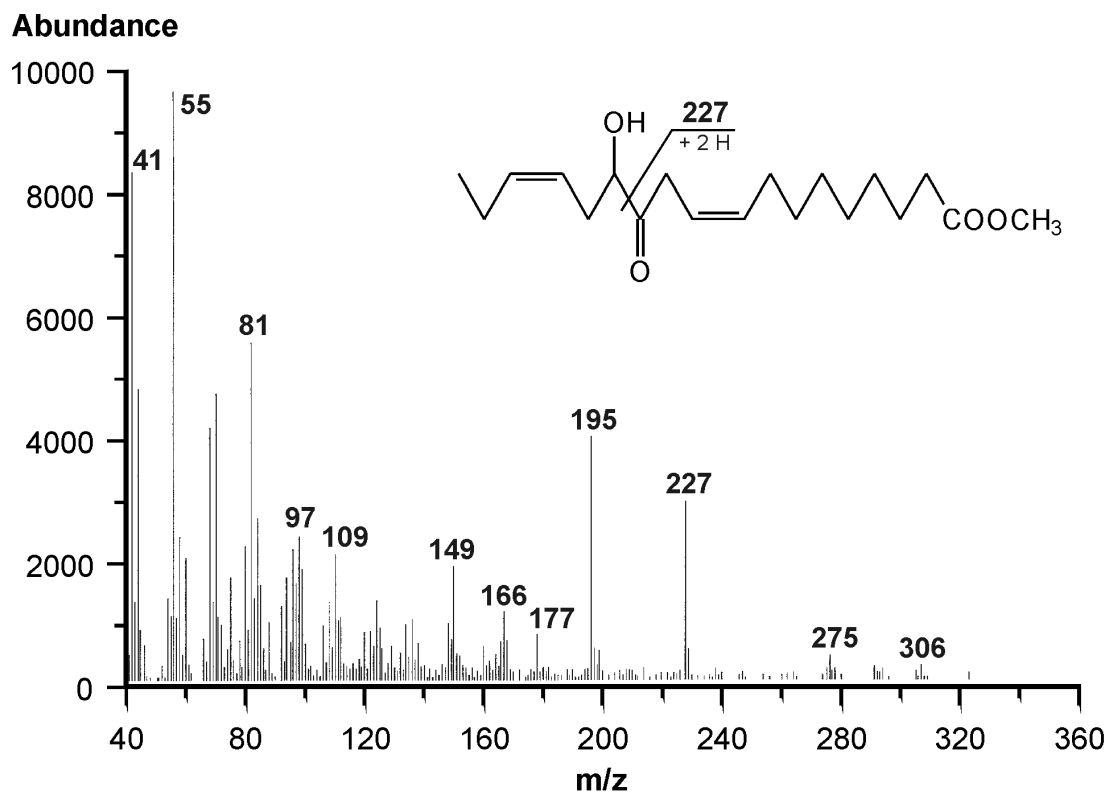


Abb. 2-58: GC-Massenspektrum (EI) von Peak 6: 12,13- α -Ketol (Me).

Die Fragmentionen m/z 306 ($[M - H_2O]^+$), 292 ($[M - CH_3OH]^+$) und 275 ($[M - H_2O - CH_3OH]^+$) legten die Vermutung nahe, daß es sich bei **Peak 7** ebenfalls um den Methylester eines Ketols handeln konnte (Abb. 2-59). Auf eine Hydroxylgruppe am C_{11} wies das Fragmention m/z 213 ($[CHOHCH=CH(CH_2)_7COOCH_3]^+$) hin. Abspaltung von Methanol und Wasser konnten zu den Ionen m/z 195 ($[m/z 213 - H_2O]^+$) und 181 ($[m/z 213 - CH_3OH]^+$) geführt haben. Die Position der Ketogruppe konnte jedoch nicht eindeutig bestimmt werden.

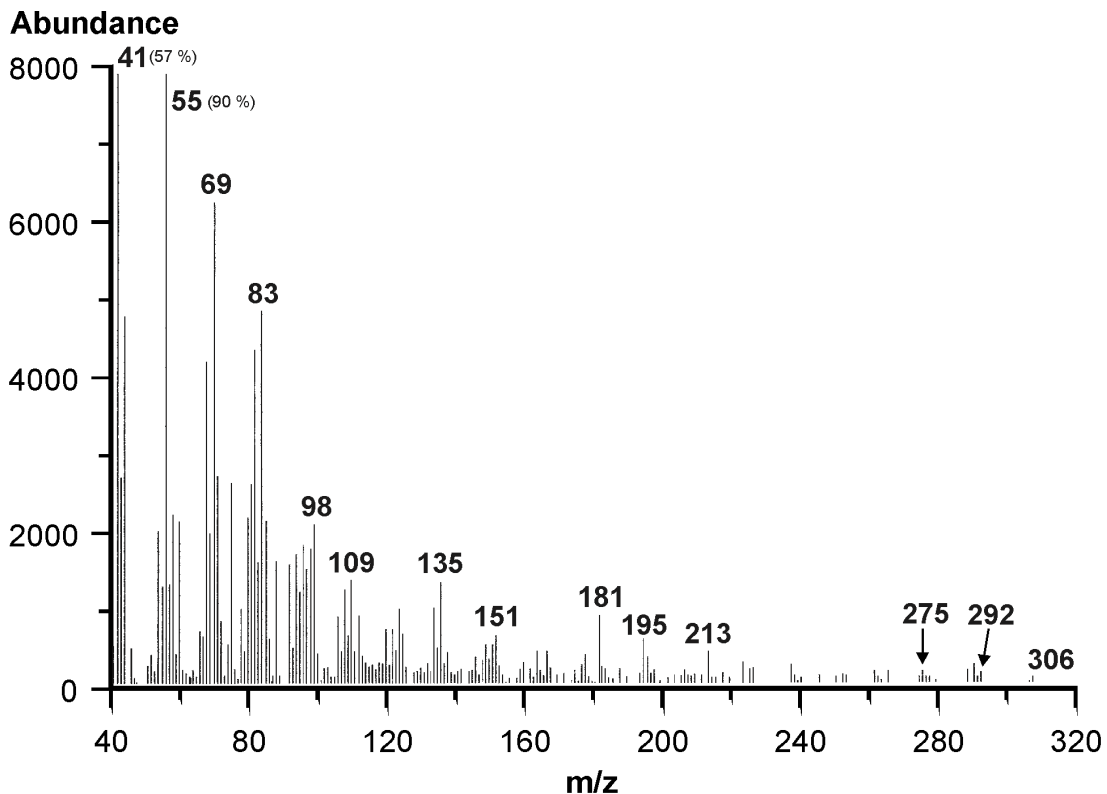


Abb. 2-59: GC-Massenspektrum (EI) von Peak 7.

2.10.2. GC-MS-Analytik nach Darstellung der Methylester, O-Methyloxime und Trimethylsilylether

Durch die Darstellung der O-Methyloxim (MO)- und Trimethylsilylether (TMS)-Derivate können zusätzliche Informationen über die Position von Keto- bzw. Hydroxylgruppen erhalten werden. Es wurde daher versucht, durch Derivatisierung die bisher erfolgte Identifizierung der Produkte zusätzlich abzusichern und die Struktur noch unbekannter Metabolite nach Möglichkeit aufzuklären. Bei der Darstellung der O-Methyloxime wurden zwei Isomere (*syn*-, *anti*-Diastereomere) als Produkte erhalten, so daß jede Verbindung mit einer Ketogruppe zwei Peaks im Chromatogramm ergab. Die Derivatisie-

rung erfolgte in der Reihenfolge: 1. Methylierung, 2. O-Methyloxime und 3. Trimethylsilylierung. Wurde dagegen die Trimethylsilylierung als 2. Schritt durchgeführt, so konnte bei einigen Metaboliten eine Enolisierung der Ketogruppen beobachtet werden (Einführung von 2 TMS-Gruppen ins Molekül). Zur Derivatisierung wurde die gleiche Probe herangezogen, die zuvor schon nach Darstellung der Methylester gaschromatographisch analysiert wurde.

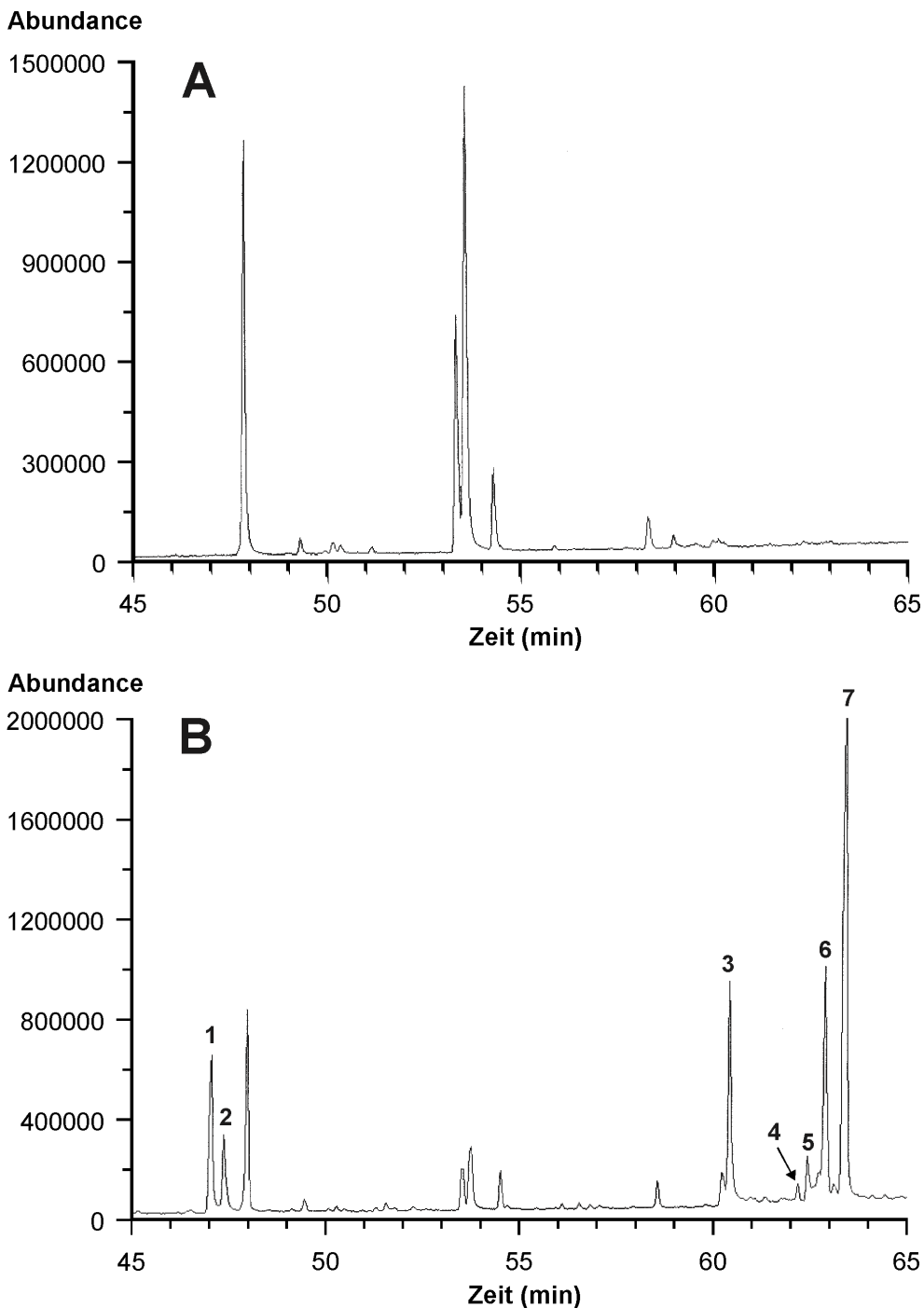


Abb. 2-60: GC-Chromatogramm nichtflüchtiger Metabolite (Me, MO, TMS).
A: Blindwert, B: Rohextrakt + 13-HPOT.

Abb. 2-60 zeigt einen Ausschnitt aus den Chromatogrammen, in dem Unterschiede zwischen Blindwert (Rohextrakt ohne 13-HPOT) und dem mit 13-HPOT inkubierten Rohextrakt auftraten. Folgende Peaks wurden als Methylester endogener Fettsäuren identifiziert: 47,9 min: Palmitinsäuremethylester, 53,4 min: Linolsäuremethylester, 53,6 min: Linolensäuremethylester, 54,3 min: Stearinsäuremethylester.

Bei den **Peaks 1** und **2** handelte es sich um die isomeren O-Methyloxim-Derivate des 12-Oxo-10E-dodecensäuremethylesters. Das Massenspektrum (Abb. 2-61) zeigte das Moleküllion m/z 255 sowie u. a. die Fragmentationen m/z 224 ($[M - \text{CH}_3\text{O}]^+$), 192 ($[m/z$ 224 - $\text{CH}_3\text{OH}]^+$), 112 ($[M - (\text{CH}_2)_6\text{COOCH}_3]^+$), 98 ($[M - (\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3]^+$), 81 ($[m/z$ 112 - $\text{CH}_3\text{O}]^+$) und 67 ($[m/z$ 98 - $\text{CH}_3\text{O}]^+$).

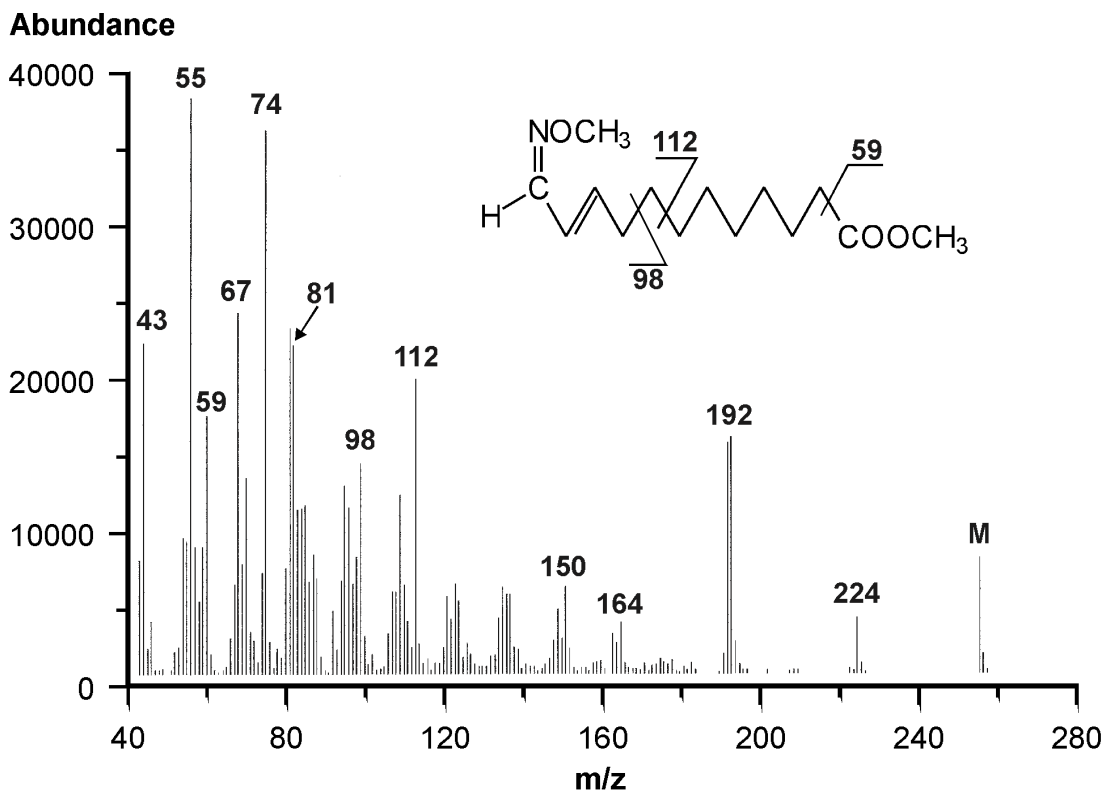


Abb. 2-61: GC-Massenspektrum (EI) von Peak 1 und 2: 12-Oxo-10E-dodecensäure (Me, MO).

Peak 3 wurde als TMS-Derivat von 13-Hydroxy-9Z,11E-15Z-octadecatriensäuremethylester identifiziert (Abb. 2-62). Die Intensität des Moleküllions bei m/z 380 war äußerst gering ausgeprägt. Die Abspaltung von $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2]$ bzw. von $[\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3]$ führte zu den diagnostisch wichtigen Fragmentationen m/z 311 und 171. Weitere Ionen wurden bei m/z 365 ($[M - \text{CH}_3]^+$), 333 ($[m/z$ 365 - $\text{CH}_3\text{OH}]^+$), 221 ($[m/z$ 311 - $(\text{CH}_3)_3\text{SiOH}]^+$), 75 ($[(\text{CH}_3)_2\text{SiOH}]^+$) und 73 ($[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$) detektiert. Das Spektrum war mit [35] in Übereinstimmung.

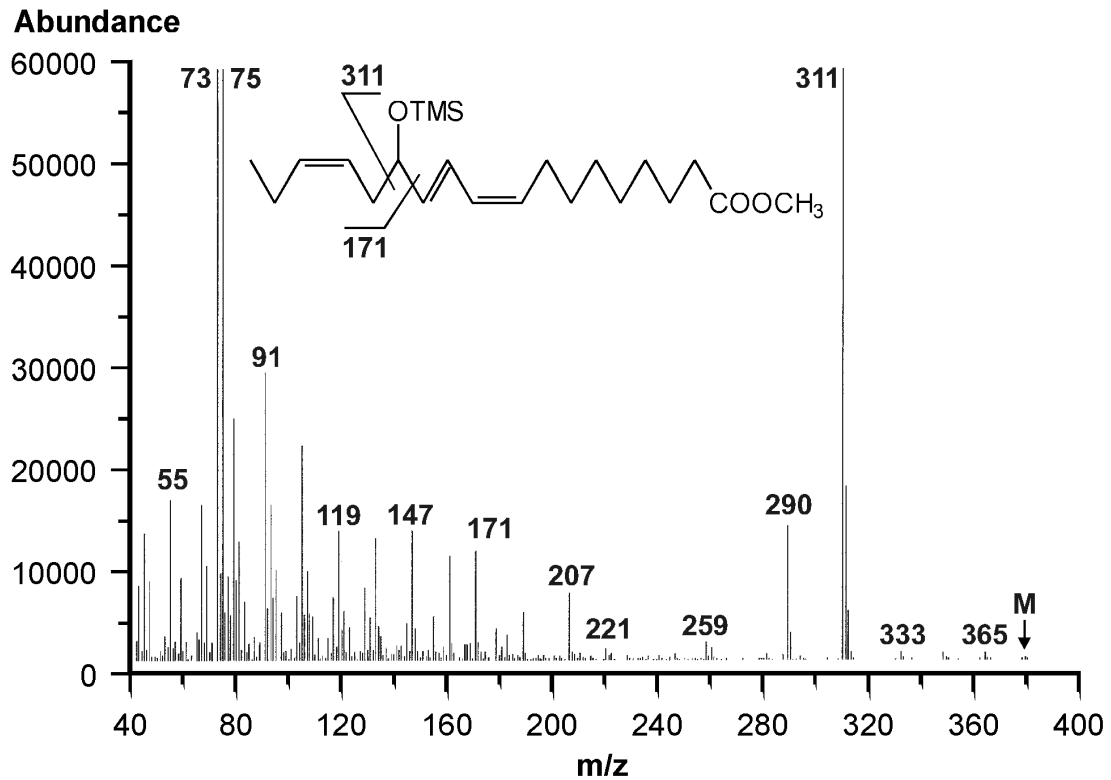


Abb. 2-62: GC-Massenspektrum (EI) von Peak 3: 13-HOT (Me, TMS).

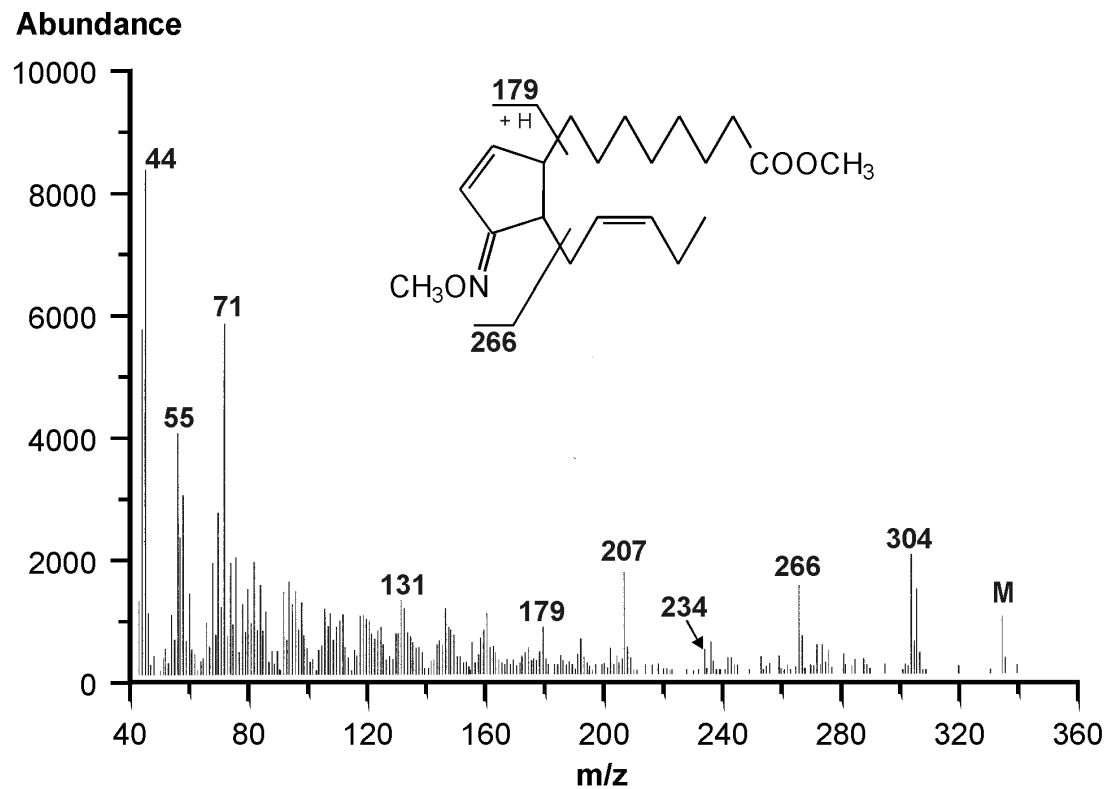


Abb. 2-63: GC-Massenspektrum (EI) von Peak 4: 12-oxo-PDA (Me, MO).

Peak 4 war ein Isomer des O-Methyloxim-Derivates des 12-Oxo-phytyldiensäuremethylesters (Abb. 2-63). Das zweite Isomer eluierte bei 62,8 min und konnte nicht vollständig von Peak 6 getrennt werden. Das erhaltene Massenspektrum stimmte mit VICK und ZIMMERMAN [36] überein und wies u. a. folgende Ionen auf: m/z 335 ($[M]^+$), 304 ($[M - CH_3O]^+$), 266 ($[M - CH_2CH=CHCH_2CH_3]^+$), 234 ($[m/z 266 - CH_3OH]^+$) und 179 ($[M - (CH_2)_7COOCH_3 + H]^+$).

Bei **Peak 5** handelte es sich um eine Fettsäure mit einer Keto- und Hydroxylgruppe (Abb. 2-64). Das Molekülion wurde bei m/z 425 detektiert. Die Fragmentationen m/z 259 und 237 ($[M - (CH_2)_7COOCH_3 - CH_3O]^+$) deuteten darauf hin, daß die Hydroxylgruppe am C₉ lokalisiert war. Weitere Ionen befanden sich bei m/z 410 ($[M - CH_3]^+$), 394 ($[M - CH_3O]^+$), 356 ($[M - CH_3CH_2CH=CHCH_2]^+$), 324 ($[m/z 356 - CH_3OH]^+$), 304 ($[m/z 394 - (CH_3)_3SiOH]^+$) und 73 ($[(CH_3)_3Si]^+$). Diese Ionen befanden zwar sich im Einklang mit den in der Literatur für 12-Oxo-9-hydroxy-10*E*,15*Z*-octadecadiensäure (9,12- γ -Ketol) beschriebenen [37], aber die Position der Ketogruppe war aus dem Spektrum nur schwer zu erkennen. Die α -Spaltung an dem die $NOCH_3$ -Gruppe tragenden C-Atom war nicht sehr ausgeprägt, so daß ein Fragmentation bei m/z 342 ($[M - CH_3CH_2CH=CH(CH_2)_2]^+$) nicht detektiert werden konnte, wohl aber bei m/z 285 ($[M - CH_3CH_2CH=CH(CH_2)_2C=NOCH_3]^+$).

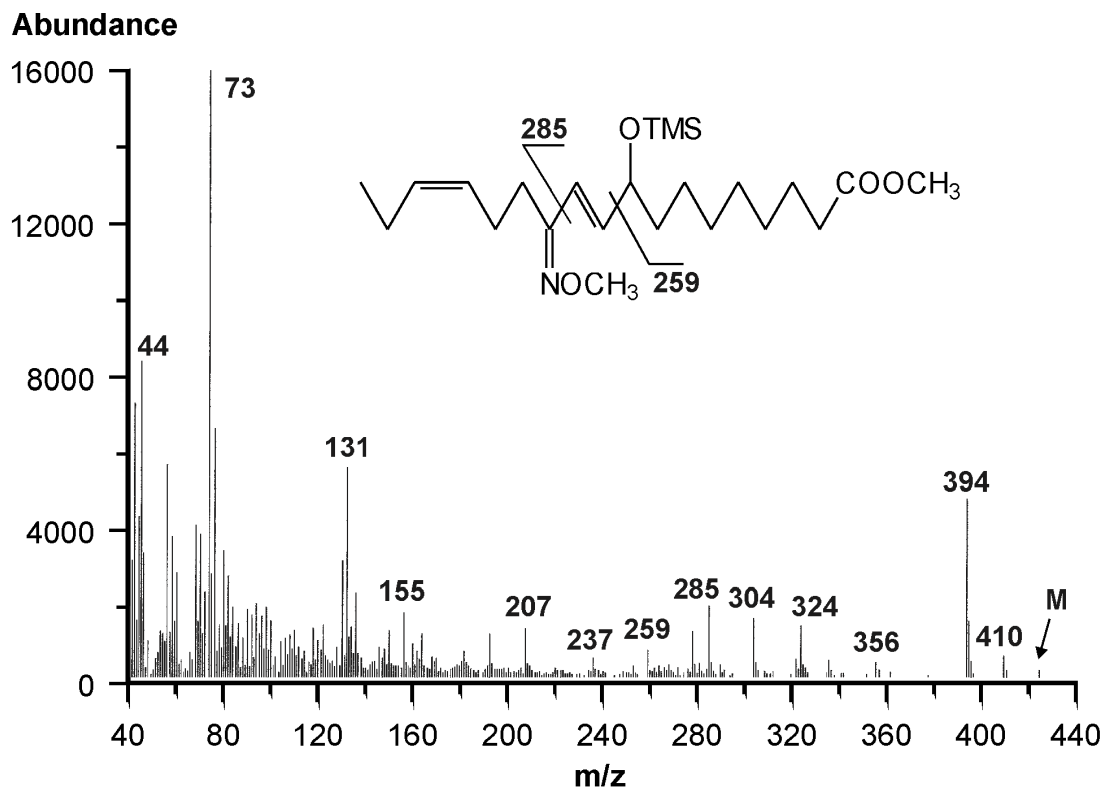


Abb. 2-64: GC-Massenspektrum (EI) von Peak 5 und 6: 9,12- γ -Ketol (Me, MO, TMS).

Peak 6 und **7** besaßen bis auf wenige Unterschiede in den Intensitäten der Fragmentationen qualitativ das gleiche Massenspektrum (Abb. 2-65). Das derivatisierte Produkt hatte ein Moleküllion von m/z 425. Aufgrund der Ionen m/z 356 ($[M - CH_3CH_2CH=CHCH_2]^+$), 171 ($[CH_3CH_2CH=CHCH_2CH-OTMS]^+$) und 81 ($[m/z 171 - (CH_3)_3SiOH]^+$) konnte die Position der Hydroxylgruppe dem C_{13} zugeordnet werden. Weitere Ionen befanden sich bei m/z 410 ($[M - CH_3]^+$), 394 ($[M - CH_3O]^+$), 324 ($[m/z 356 - CH_3OH]^+$), 266 ($[m/z 356 - (CH_3)_3SiOH]^+$) und 73 ($[(CH_3)_3Si]^+$). Für das Fragmentation m/z 192 schlugen VICK und ZIMMERMAN die zweifache Abspaltung von $[CH_3O]$ aus $[C=NOCH_3CH_2CH=CH(CH_2)_7COOCH_3]^+$ vor [37], was auf eine Ketogruppe am C_{12} hindeutete. Aufgrund des mit [37] übereinstimmenden Fragmentierungsschemas wurden Peak 6 und 7 als derivatisierte 13-Hydroxy-12-oxo-9Z,15Z-octadecadiensäure (12,13- α -Ketol) identifiziert.

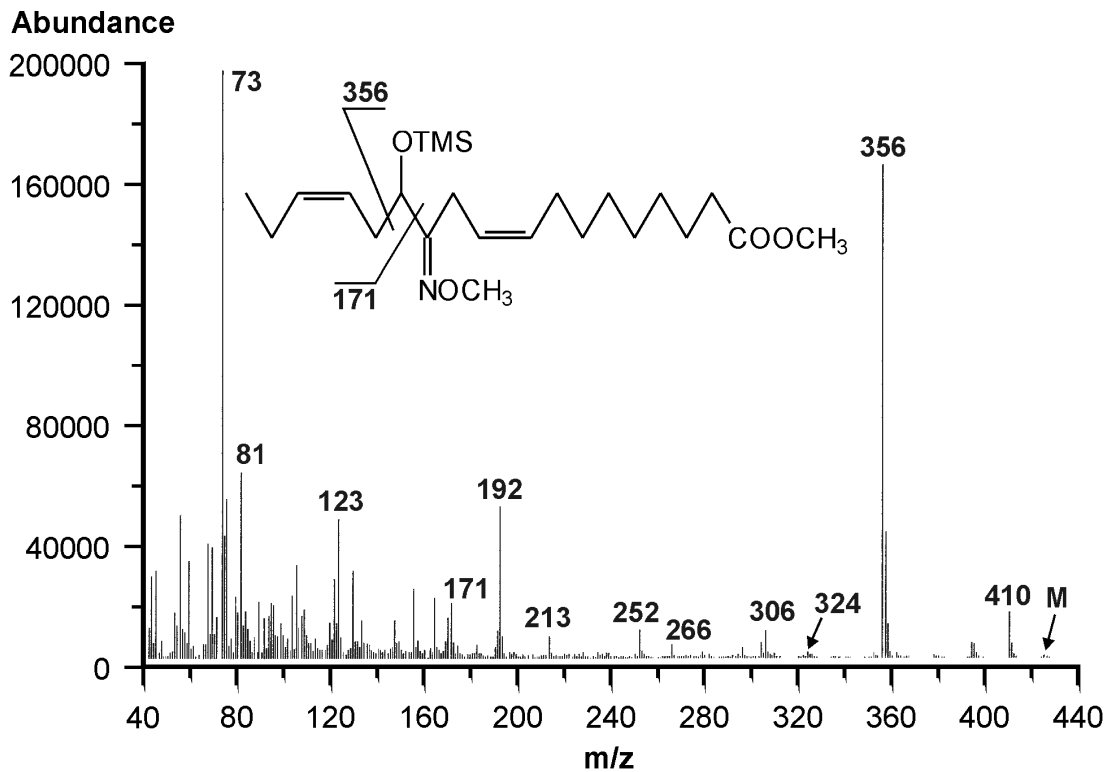


Abb. 2-65: GC-Massenspektrum (EI) von Peak 7: 12,13- α -Ketol (Me, MO, TMS).

Unter Anwendung einer umfangreichen Derivatisierungsprozedur (Methylester, O-Methyloxime, Trimethylsilylether) konnten einige nichtflüchtige Nebenprodukte aus 13-HPOT, die auch als **Oxylipide** bezeichnet werden [38, 39], qualitativ nachgewiesen werden. Für eine quantitative Bestimmung eignete sich diese GC-MS-Methodik jedoch nicht, da zum einen Probleme mit einer vollständigen Derivatisierung auftraten und

zum anderen die Trennung der isomeren Derivate von 9,12- γ -Ketol und 12-oxo-PDA aufgrund von Koelution nicht möglich war.

Das Substrat 13-HPOT war als Methylester ebenfalls nur unter starker Artefakt-Bildung gaschromatographierbar. Zwar hätte mit einer Reduktion der Hydroperoxidgruppe dieses Problem umgangen werden können, aber dann wäre keine Unterscheidung mehr zwischen dem nach Ablauf der Inkubation noch vorliegenden Substrat und u. U. während der Inkubation gebildetem 13-HOT möglich gewesen. Zur Aufstellung einer Bilanz für das Substrat wurde daher die Entwicklung einer HPLC-Methode beabsichtigt, die 13-HPOT direkt erfassen konnte.

2.11. HPLC-Analytik nichtflüchtiger Metabolite

Das 12,13- α -Ketol, offensichtlich eines der Hauptprodukte unter den Oxylipiden (vgl. Abb. 2-60), besitzt keine chromophore Gruppe und wurde mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) bei 210 nm nur sehr unempfindlich detektiert. Versuche, durch Derivatisierung mit z. B. 2,4-Dinitrophenylhydrazin ein Chromophor in das Molekül einzuführen, waren infolge unvollständiger Umsetzung nicht erfolgreich.

Im Vergleich zum DAD erschien der Lichtstreu-Detektor (Evaporative Light-Scattering Detector, ELSD) als sinnvolle Alternative. Unter der Voraussetzung, daß zwischen einem Analyten und dem verwendeten Fließmittel eine ausreichende Differenz hinsichtlich der Flüchtigkeit besteht, können alle Verbindungen, auch ohne Chromophor, detektiert werden. Im Umkehrphasen-Modus wurde mit unterschiedlichen Säulen (RP-18, Diol, Cyanopropyl) und Gradientensystemen (Acetonitril/Wasser, Methanol/Wasser) keine ausreichende Trennung erreicht.

Das beste Resultat wurde mit einer Diol Säule im Normalphasen-Modus und einem Gradientensystem aus *n*-Hexan/Isopropanol erzielt. Die Proben wurden nach Methylierung chromatographiert, da die Peaks der freien Säuren trotz eines Zusatzes von Essigsäure zum Fließmittel im Gegensatz zu den Methylestern ein starkes Tailing zeigten. Außerdem eluierten die Methylester früher und konnten so von dem z. T. extrahierten Triton X-100 (Solubilisierung der Hydroperoxid-Lyase in den Rohextrakten) abgetrennt werden.

Mit Hilfe der entwickelten HPLC-Analytik konnte nun erstmalig überprüft werden, ob nach Ablauf der Inkubationszeit noch Substrat in der Probe vorlag. Hierzu wurden Rohextrakte (0,1 % Triton X-100) aus 5 g Keimlingen mit bzw. ohne Zusatz von $11,2 \text{ mmol kg}^{-1}$ 13-HPOT 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (vgl. 4.6.3.). In Abweichung zur bisherigen Vorgehensweise erfolgte die Isolierung der Produkte, die anschließend methyliert wurden (vgl. 4.3.1.), nach 4.9. Um Artefakte zu erkennen, die möglicherweise auf chemischen Weg aus dem Substrat gebildet wurden, wurde 13-HPOT während der Inkubation, Extraktion und Methylierung identisch wie die oben genannten Proben behandelt.

Abb. 2-66 zeigt eine Gegenüberstellung der durch ELSD-Detektion erhaltenen Chromatogramme von einem mit 13-HPOT versetzten Rohextrakt (A), Blindwert (B) und Substrat (C). Nach Ablauf der Inkubationszeit war 13-HPOT in Probe A nicht mehr nachweisbar, während dafür im Vergleich zum Blindwert zahlreiche Peaks detektiert wurden, die offensichtlich auf den Metabolismus von 13-HPOT in dem Rohextrakt zurückzuführen waren. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen wurde die Bildung von Artefakten aus 13-HPOT ausgeschlossen (Probe C).

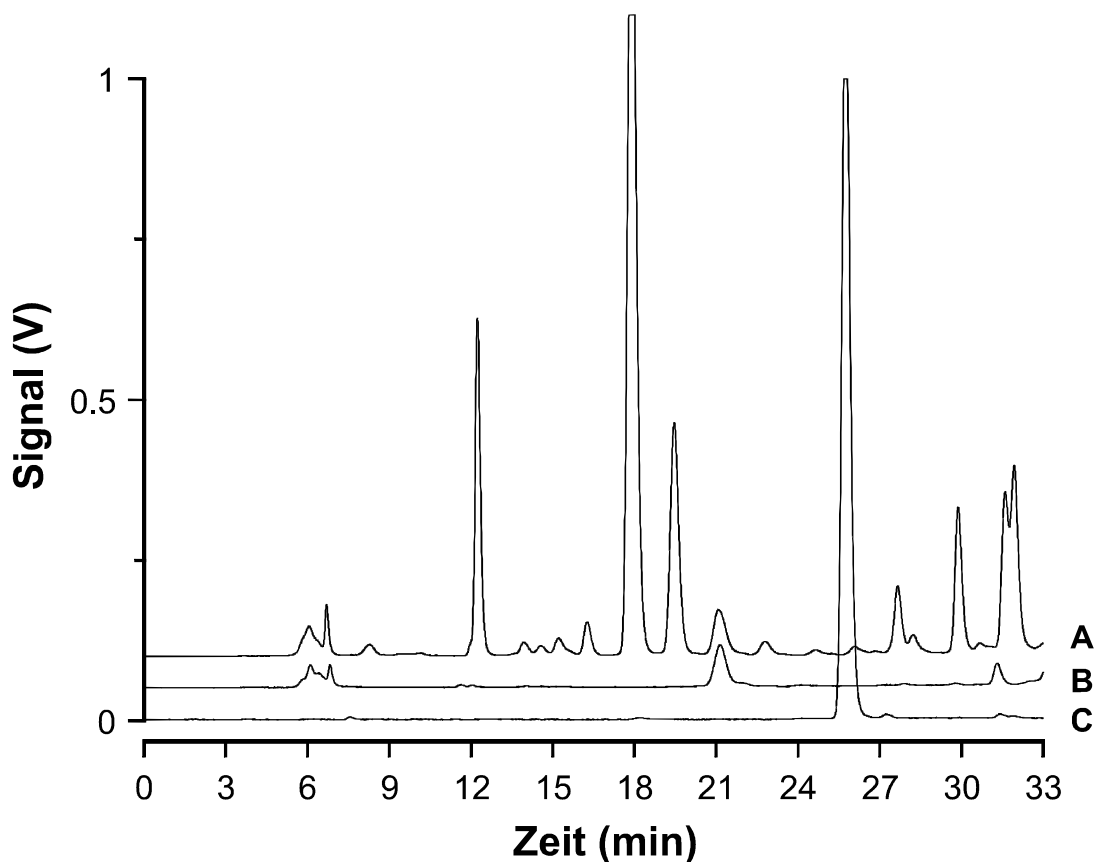


Abb. 2-66: HPLC-ELSD-Analytik der Oxylipide (Methylester). A: Rohextrakt + 13-HPOT, B: Blindwert (Rohextrakt ohne 13-HPOT), C: 13-HPOT.

2.11.1. HPLC-Analytik der Oxylipide mit unterschiedlichen Detektionssystemen

Die herausragende Stellung des ELSD bei der Analytik der Oxylipide wurde besonders im Vergleich zu einem Diodenarray-Detektor (DAD) deutlich. Beide Detektoren waren seriell angeordnet: 1. DAD, 2. ELSD. Als Detektionswellenlängen wurden 235 nm (Absorptionsmaximum von Verbindungen mit konjugiertem Dien-System) und 210 nm (Verbindungen ohne Chromophor) ausgewählt.

Zur Identifizierung der Peaks wurde das chromatographische System mit der Particle-Beam Massenspektrometrie (PB-MS) gekoppelt, was aufgrund der geringen Flußrate von $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ problemlos möglich war. Die mit den drei Detektionssystemen erhaltenen Chromatogramme sind in Abb. 2-67 dargestellt. Peaks, die aus dem Substrat hervorgingen und deren Struktur aufgeklärt werden konnte, sind mit den Nummern 1-8 versehen.

Mit dem ELSD und der PB-MS wurden qualitativ identische Chromatogramme erhalten. Dies wurde darauf zurückgeführt, daß die Vernebelung und Verdampfung des HPLC-Eluenten bei beiden Detektoren vergleichbar waren. Nur nichtflüchtige Verbindungen, die nach der Verdampfung des HPLC-Eluenten als feiner Partikel-Nebel vorlagen, konnten nachfolgend entweder aufgrund Ionisation (PB-MS) oder Lichtstreuung (ELSD) detektiert werden.

Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Chromatogramme des ELSD und des DAD deutlich voneinander. Peak 1 trat vor allem bei 210 nm auf, konnte aber weder mit dem ELSD noch der PB-MS detektiert werden. Daher lag die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um einen flüchtigen Metaboliten handelte. Das gleiche galt möglicherweise für einen der beiden Peaks 2 und 3, die nur in den Chromatogrammen bei 210 nm und in geringerem Ausmaß bei 235 nm vorkamen. Peak 4 war in der vorliegenden Konzentration UV-inaktiv und auch Peak 5 konnte bei 210 nm nur unter hohem Verlust an Empfindlichkeit, nicht aber bei 235 nm detektiert werden. Für Peak 6 und 7 wurde sowohl mit dem ELSD als auch bei 235 nm ein vergleichbares Signal erhalten. Die Detektion von Peak 8 erfolgte mit dem ELSD mit größerer Empfindlichkeit als mit dem DAD.

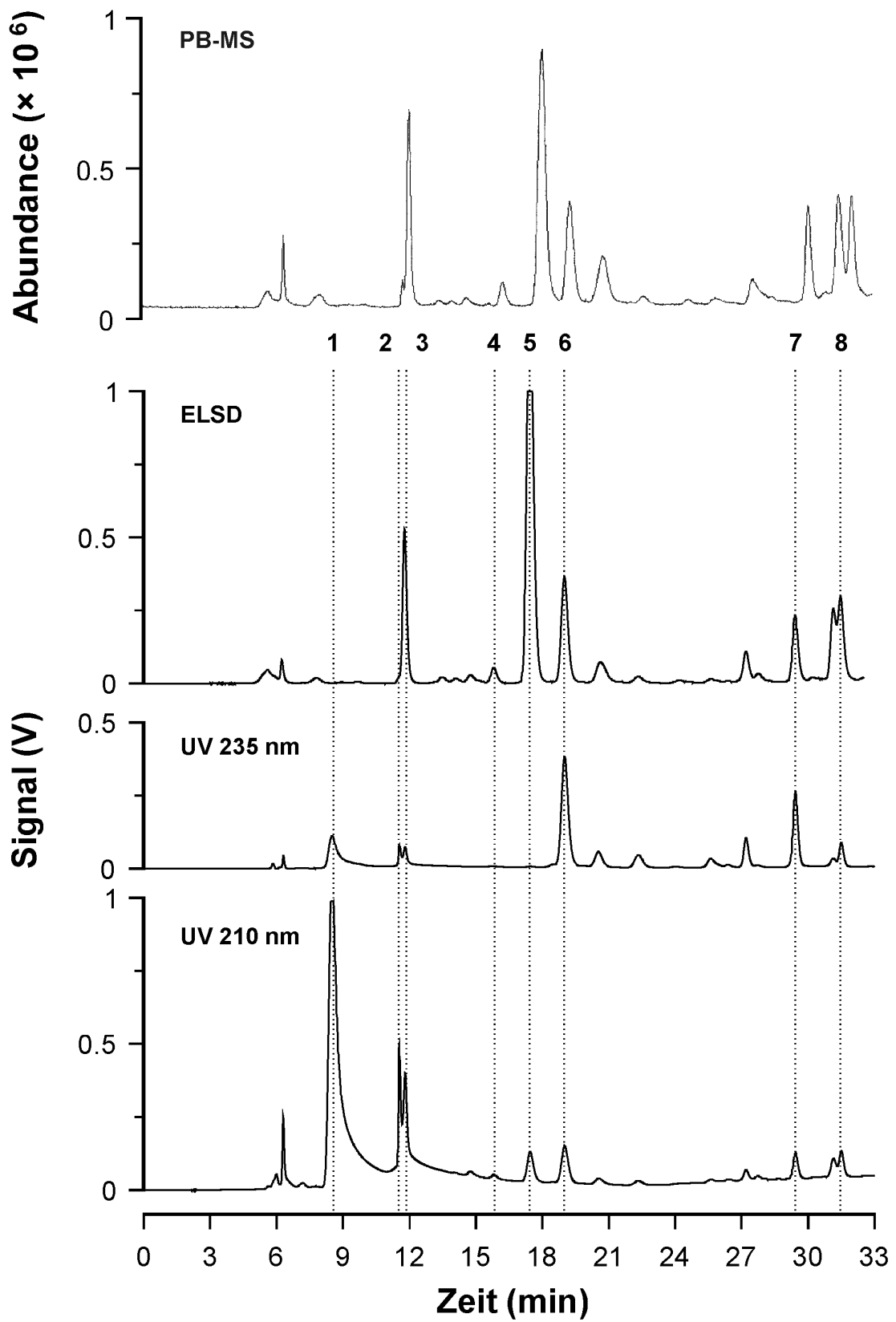


Abb. 2-67: HPLC-Analytik der Oxylipide mit unterschiedlichen Detektionssystemen.

2.11.2. Identifizierung der Oxylipide mittels HPLC-PB-MS (EI, CI)

Die Oxylipide wurden durch HPLC-Particle-Beam-Massenspektrometrie (HPLC-PB-MS) identifiziert. Die Ionisation erfolgte sowohl im EI- (Elektronenstoß-Ionisierung) als auch im CI-Modus (Chemische Ionisierung) unter Verwendung von Methan als Reaktantgas (vgl. 4.2.1.). Um die Struktur der Peaks aufzuklären, die nicht mit der PB-MS detektiert werden konnten (vgl. Abb. 2-67) und um die Struktur durch Derivatisierung zusätzlich abzusichern, wurde eine Fraktionierung mit der analytischen HPLC durchgeführt (Detektion: 210 nm). Aus 10 chromatographischen Läufen wurden die Fraktionen der Peaks 1-8, wobei sich Peak 2 und 3 zusammen in einer Fraktion befanden, gesammelt, aufkonzentriert und mit bzw. ohne Derivatisierung mittels GC-MS analysiert (vgl. 4.2.2.). In Abb. 2-67 wurde ein repräsentatives Chromatogramm der HPLC-PB-MS bereits gezeigt. Die nachfolgend verwendete Numerierung der Peaks entspricht der dort angegebenen.

Peak 1 wurde als 2E-Hexenal identifiziert (vgl. Anhang). Die Retentionszeit (GC) und das Massenspektrum stimmte mit der Referenzverbindung überein. Da es sich hierbei um eine flüchtige Verbindung handelte, konnte sie nicht mit dem ELSD bzw. der PB-MS detektiert werden, wohl aber mit dem DAD (Abb. 2-67).

Von den im UV bei 210 nm sichtbaren **Peaks 2** und **3** wurde nur einer bei der PB-MS detektiert. Das erhaltene EI-Spektrum stimmte mit dem des bereits durch GC-MS identifizierten 12-Oxo-phytodiensäuremethylesters (12-oxo-PDA-Me) überein (vgl. Abb. 2-57). Das CI-Spektrum zeigte das Quasi-Molekülion $[M + H]^+$ bei m/z 307 sowie Methan-Addukte bei m/z 335 ($[M + C_2H_5]^+$) und m/z 347 ($[M + C_3H_5]^+$) (Abb. 2-68). Eine genaue Zuordnung der Verbindung zu Peak 2 oder 3 war anhand der Retentionszeiten nicht sicher möglich, da diese sehr ähnlich waren. Durch GC-MS-Analytik der Fraktion, die beide Peaks gemeinsam enthielt, konnte zusätzlich 12-Oxo-10E-dodecensäuremethylester identifiziert werden.

Ein Co-Chromatographie Experiment sollte über die Peak-Reihenfolge bei der HPLC Aufschluß geben. Hierzu wurde 12-Oxo-10E-dodecensäuremethylester mittels mikropräparativer Gaschromatographie (vgl. 4.2.2.) aus einer Probe als Referenzverbindung isoliert. Anschließend wurde die isolierte Verbindung einer für die HPLC-Analytik bestimmten Probe zugesetzt und das Chromatogramm bei 210 nm aufgezeichnet. Hierbei konnte gezeigt werden, daß im Vergleich zu einer nicht dotierten Probe das Signal des ersten Peaks größer war. Somit handelte es sich bei **Peak 2** um 12-Oxo-10E-dodecensäuremethylester und bei **Peak 3** um 12-oxo-PDA-Me.

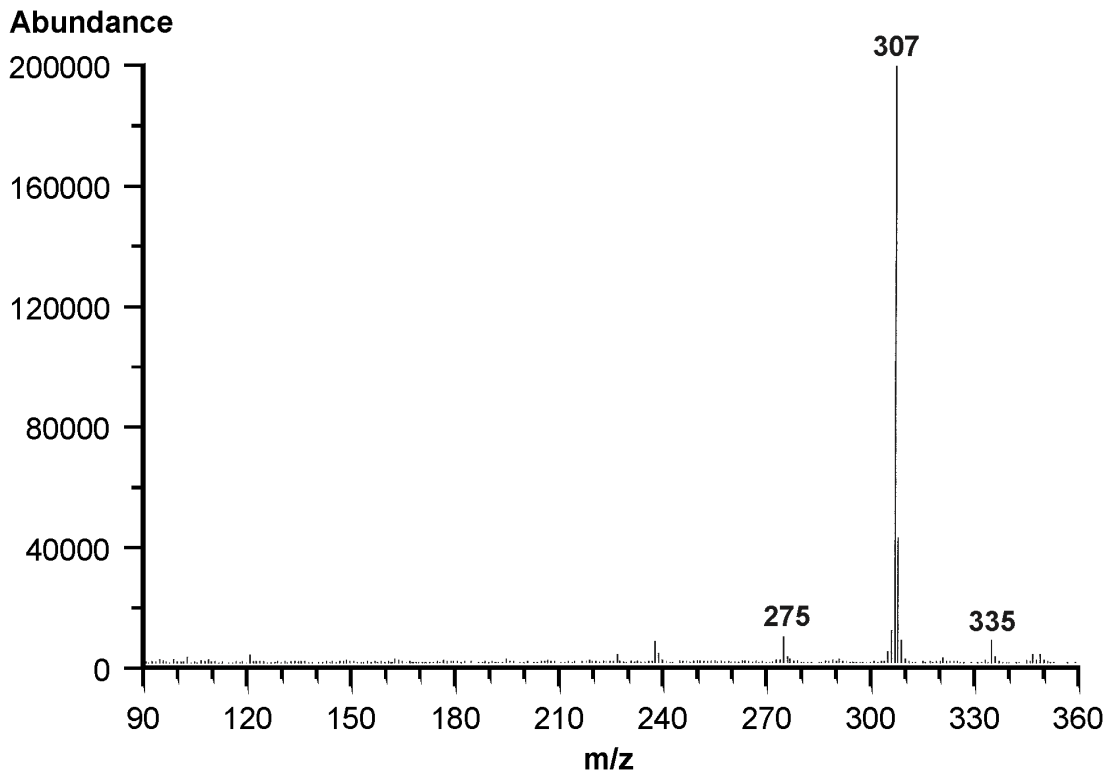


Abb. 2-68: PB-Massenspektrum (CI) von Peak 3: 12-oxo-PDA (Me).

Peak 4 wurde als Methylester der 11-Hydroxy-12-oxo-9Z,15Z-octadecadiensäure (11,12- α -Ketol) identifiziert (Abb. 2-69). Das Massenspektrum (EI) des Methylesters zeigte ein teilweise vergleichbares Fragmentierungsmuster wie die in [40] beschriebene freie Säure. Aufgrund des Fragmentes m/z 213 ($[M - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}]^+$), das durch α -Spaltung entstand, und der nachfolgenden Abspaltung von Wasser (m/z 195) wurde die Hydroxylgruppe dem C₁₁ zugeordnet. Einen Hinweis darauf, daß sich die Ketogruppe am C₁₂ befand, lieferten die ebenfalls aus der α -Spaltung resultierenden Fragmentationen m/z 242 ($M - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2 + \text{H}^+$) und m/z 111 ($[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}]^+$). Weitere charakteristische Fragmentationen waren m/z 306 ($[M - \text{H}_2\text{O}]^+$), 293 ($[M - \text{CH}_3\text{O}]^+$), 275 ($[M - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3\text{O}]^+$), 181 ($[m/z 213 - \text{CH}_3\text{OH}]^+$), 163 ($[m/z 181 - \text{H}_2\text{O}]^+$), 135 ($[m/z 163 - \text{CO}]^+$).

Das Molekülion m/z 324 konnte im EI-Spektrum kaum detektiert werden. Hier war die chemische Ionisation hilfreich, die das Quasi-Molekülion $[M + \text{H}]^+$ bei m/z 325 anzeigte (Abb. 2-70). Obwohl die chemische Ionisierung schonender verläuft als die Elektronenstoß-Ionisierung, traten Fragmentationen (m/z 307, 293, 275) auf, die auf den Verlust von Wasser und Methanol zurückzuführen waren.

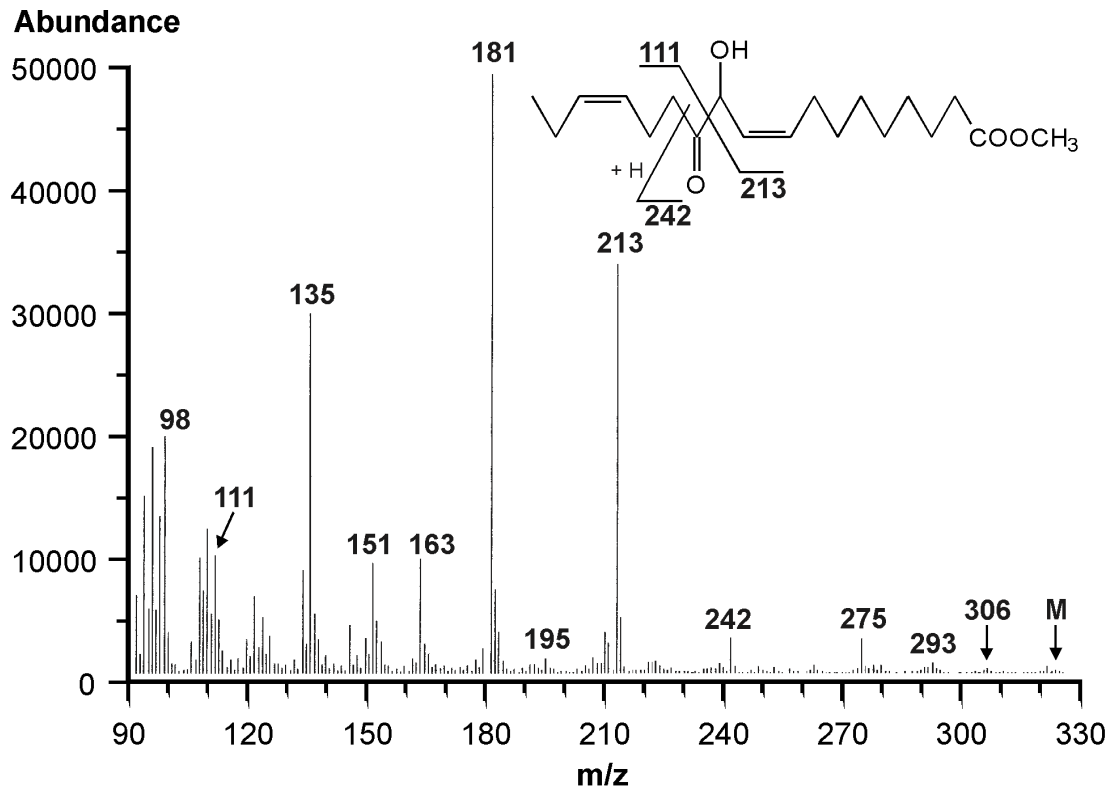


Abb. 2-69: PB-Massenspektrum (EI) von Peak 4: 11,12- α -Ketol (Me).

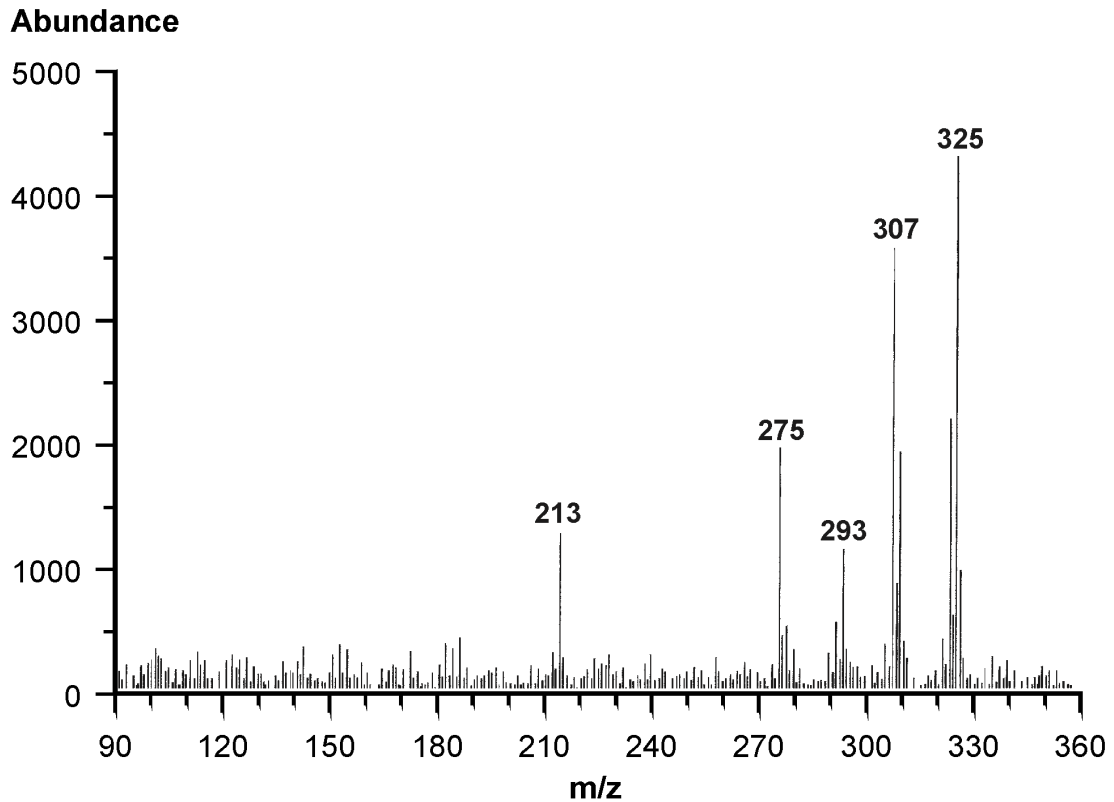


Abb. 2-70: PB-Massenspektrum (CI) von Peak 4: 11,12- α -Ketol (Me).

Bei der zuvor beschriebenen GC-MS-Analytik der Methylester (vgl. 2.10.1.) wurde das Spektrum eines Ketols erhalten, das nicht eindeutig identifiziert werden konnte (vgl. Abb. 2-59). Es wies Ionen bei m/z 213 und 181 auf und besaß auch sonst die für das 11,12- α -Ketol charakteristischen Fragmente, allerdings mit weitaus geringerer Intensität. Vermutlich handelte es sich bei dem Peak 7 im GC-Chromatogramm ebenfalls um den Methylester des 11,12- α -Ketols.

Das Spektrum (EI) von **Peak 5** (Abb. 2-71) zeigte ein ähnliches Fragmentierungsmuster wie das GC-Spektrum des 12,13- α -Ketol Methylesters (vgl. Abb. 2-58). Zusätzlich zu den bereits unter 2.10.1. erläuterten Fragmentionen traten in dem PB-MS Spektrum die Fragmente m/z 198 ($[\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3 + \text{H}]^+$) und 166 ($[\text{m}/z\ 198 - \text{CH}_3\text{OH}]^+$) mit hoher Intensität auf. α -Spaltung am C_{13} führte zu m/z 255 ($[\text{M} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2]^+$), das unter Verlust von Wasser und Methanol die Ionen m/z 237, 223 und 205 ergab. Das Molekülion m/z 324 war kaum detektierbar.

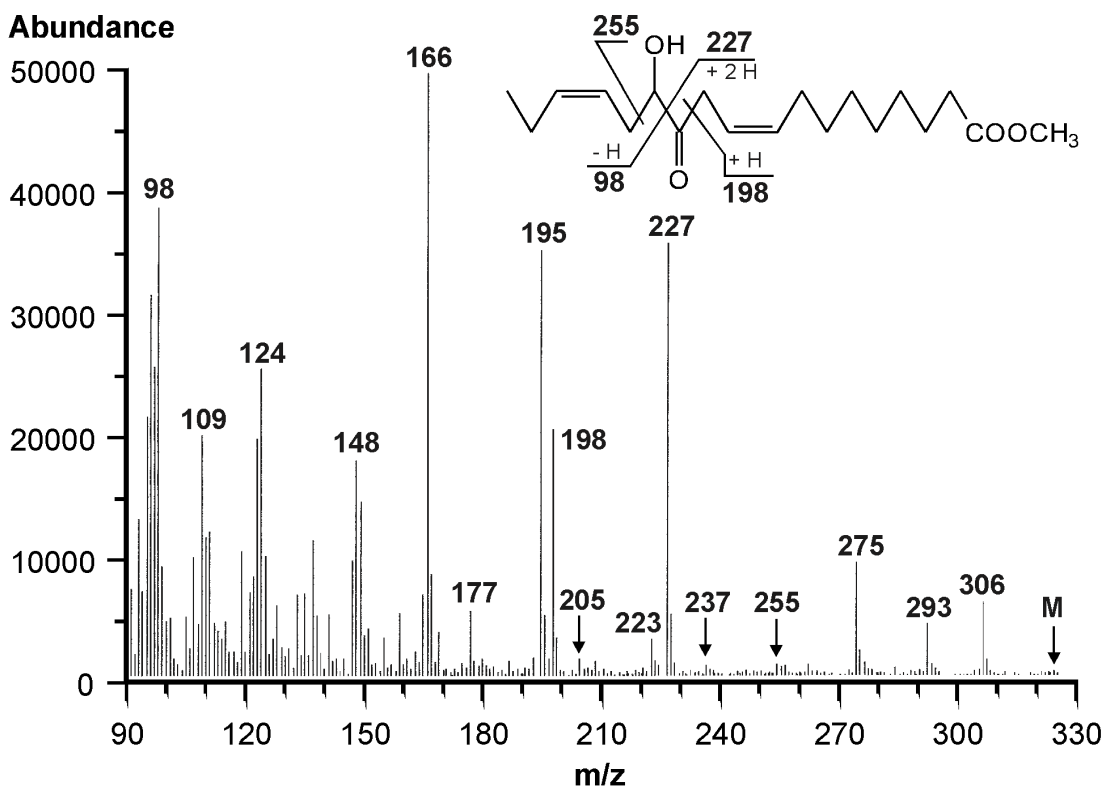


Abb. 2-71: PB-Massenspektrum (EI) von Peak 5: 12,13- α -Ketol (Me).

Auch bei chemischer Ionisierung dominierten im Vergleich zum Quasi-Molekülion die Fragmentationen (Abb. 2-72). Der größte Peak m/z 307 resultierte aus dem Verlust von Wasser aus dem Quasi-Molekülion $[M + H]^+$ bei m/z 325. Weitere Fragmente waren m/z 293 ($[M + H - CH_3OH]^+$) und 275 ($[M + H - H_2O - CH_3OH]^+$). Methan-Addukte befanden sich bei m/z 353 ($[M + C_2H_5]^+$) und m/z 365 ($[M + C_3H_5]^+$).

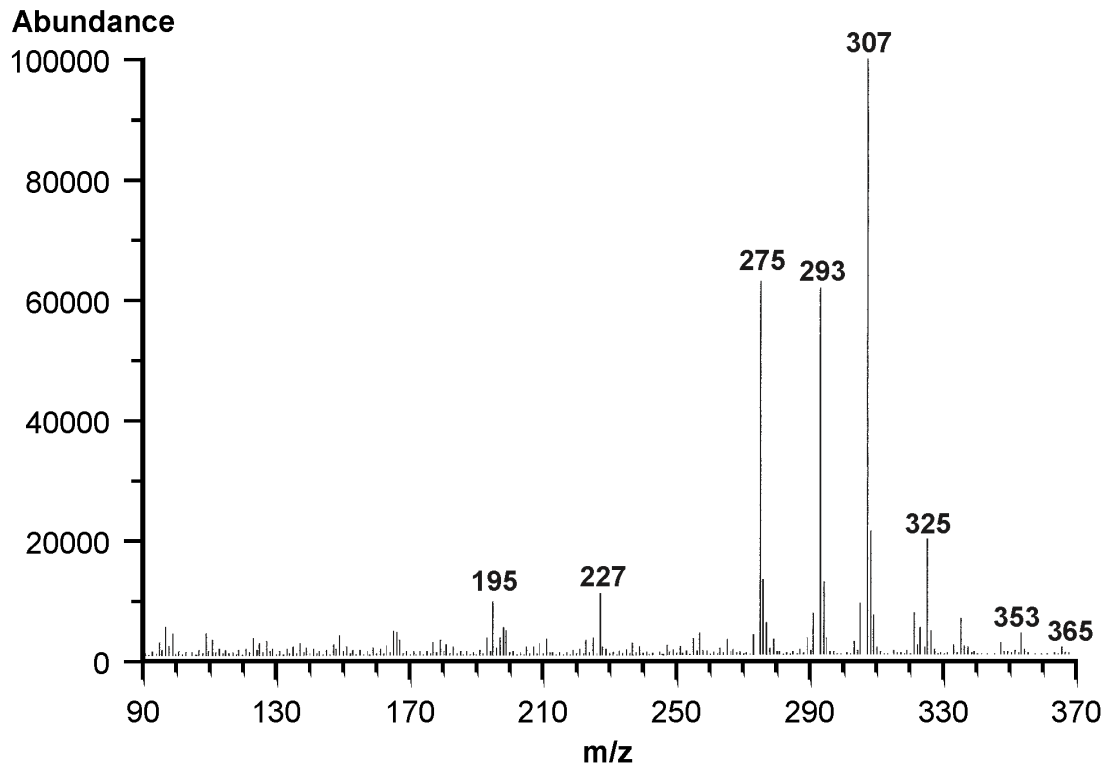


Abb. 2-72: PB-Massenspektrum (CI) von Peak 5: 12,13- α -Ketol (Me).

Nach Fraktionierung von Peak 5 mittels HPLC und anschließender Derivatisierung (MO, TMS) wurden bei der GC-MS-Analytik zwei Peaks erhalten, deren Massenspektren mit Abb. 2-65 übereinstimmten. Wurde dagegen auf eine Derivatisierung verzichtet, so lagerte sich der Methylester des 12,13- α -Ketols in eine Gruppe mehrerer Peaks um, die nur unvollständig separiert wurden (Abb. 2-73).

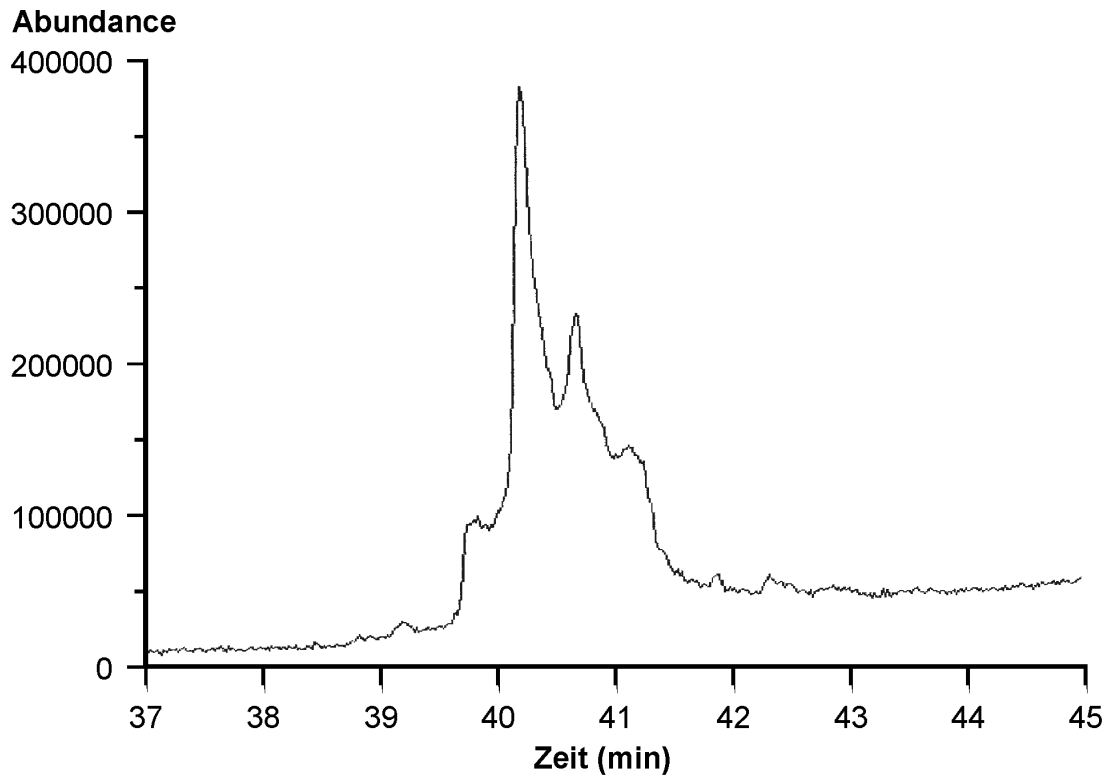


Abb. 2-73: GC-Chromatogramm von Fraktion 5: 12,13- α -Ketol (Me).

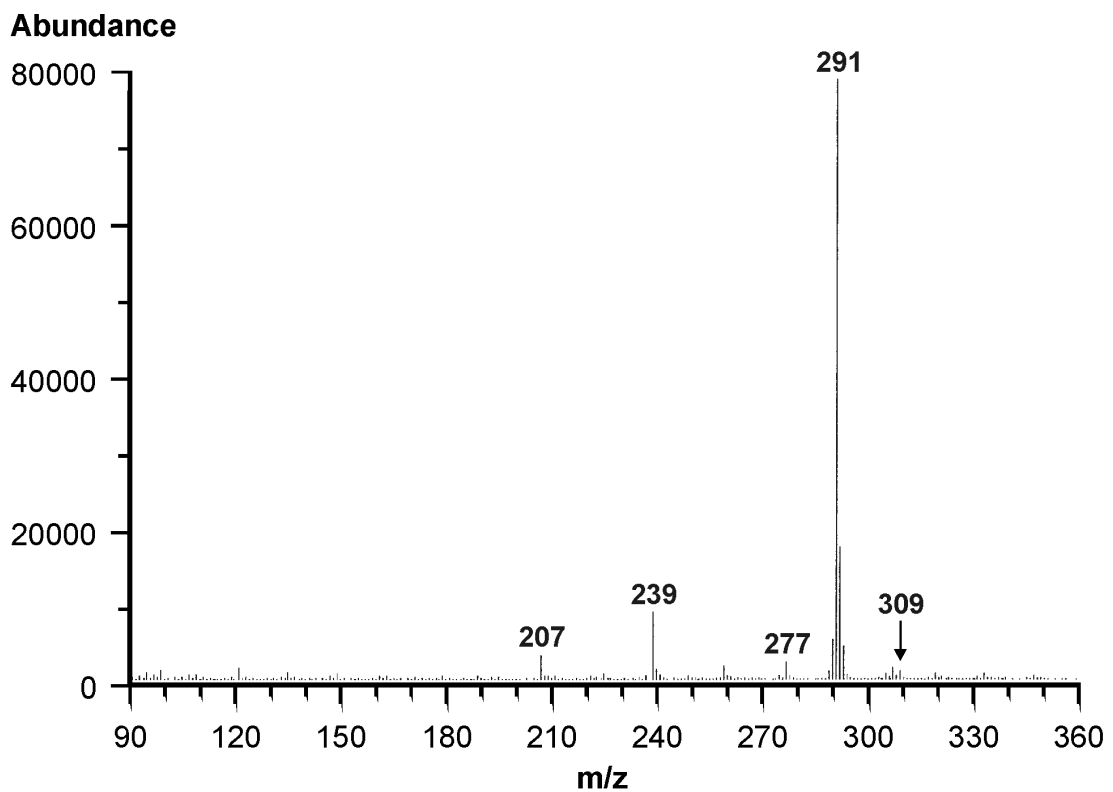


Abb. 2-74: PB-Massenspektrum (CI) von Peak 6: 13-HOT (Me).

Peak 6 wurde als Methylester der 13-Hydroxy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure (13-HOT) identifiziert. Das bei der PB-MS erhaltene EI-Massenspektrum war hinsichtlich der Fragmentierung und Peakintensitäten identisch mit dem GC-Spektrum (vgl. Abb. 2-56). Das CI-Spektrum ist in Abb. 2-74 dargestellt. Die Abspaltung von Wasser führte dazu, daß nicht das Quasi-Molekülion m/z 309 als größter Peak detektiert wurde, sondern das Fragmention m/z 291 ($[M + H - H_2O]^+$). Silylierung des fraktionierten Peaks 6 und nachfolgende GC-MS-Analytik führte zu einem mit Abb. 2-62 übereinstimmenden Massenspektrum.

Das Massenspektrum (EI) von **Peak 7** zeigt Abb. 2-75. Aufgrund des Fragmentierungsmusters im Bereich von $m/z > 270$ wurde vermutet, daß es sich um den Methylester einer Hydroxy-Fettsäure mit einem zusätzlichen Sauerstoffatom handelte, dessen Molekülion sich bei m/z 324 befand. Die Abspaltung von Wasser und Methanol konnte zu den Fragmentionen m/z 306 ($[M - H_2O]^+$) bzw. 275 ($[M - CH_3O - H_2O]^+$) geführt haben. Die Hydroxylgruppe befand sich vermutlich am C_{13} , da Fragmentionen bei m/z 239 ($[CHOHCH=CHCH=CH(CH_2)_7COOCH_3]^+$), 207 ($[m/z 239 - CH_3OH]^+$) und 189 ($[m/z 207 - H_2O]^+$) detektiert wurden. Eine sichere Lokalisierung einer zusätzlichen Keto- oder Epoxygruppe war anhand dieses Spektrums nicht möglich.

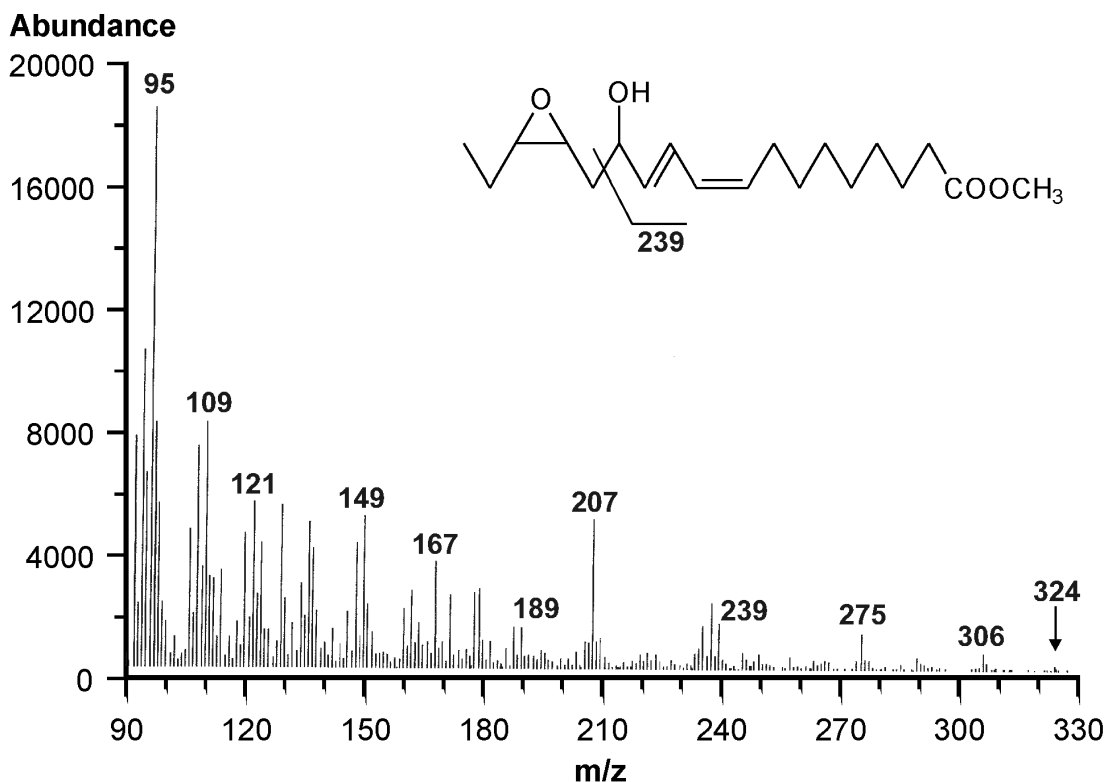


Abb. 2-75: PB-Massenspektrum (EI) von Peak 7: 15,16-EHOD (Me).

Das CI-Spektrum von Peak 7 wies eine starke Fragmentierung auf und ließ darauf schließen, daß die Verbindung möglicherweise ein instabiles Strukturelement enthielt (Abb. 2-76). Die Intensität des Quasi-Molekülions m/z 325 lag unter 5 %. Verlust von Wasser führte zu m/z 307 bzw. von Methanol zu m/z 275. Einen Hinweis auf die Abspaltung eines weiteren Moleküls Wasser lieferte m/z 289 ($[m/z$ 307 - $H_2O]^+$). Weitere Fragmentationen befanden sich bei m/z 239 ($[CHOHCH=CHCH=CH(CH_2)_7COOCH_3]^+$), m/z 257 ($[m/z$ 289 - $CH_3OH]^+$) und 207 ($[m/z$ 239 - $CH_3OH]^+$).

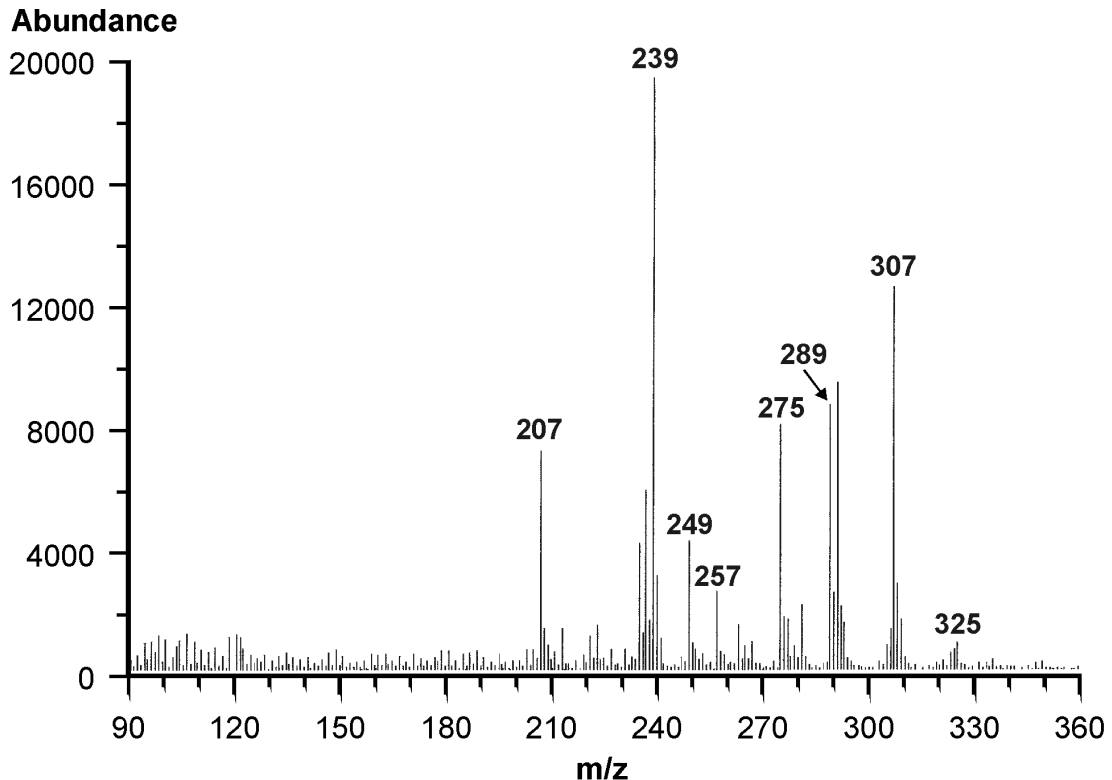


Abb. 2-76: PB-Massenspektrum (CI) von Peak 7: 15,16-EHOD (Me).

Erst die HPLC-Fraktionierung und Darstellung des TMS-Derivates ermöglichte die Identifizierung von Peak 7 (Abb. 2-77). Die Trimethylsilylierung von Ketolen mit MSTFA führte ohne vorherige Fixierung der Ketogruppe als O-Methyloxim aufgrund von Enolisierung zu di-silylierten Derivaten mit einem Molekülion von m/z 468. Da dies nicht beobachtet wurde, war das Vorliegen einer Epoxygruppe möglich. Das Ion bei m/z 396 stimmte mit dem berechneten Molekulargewicht einer Epoxy-Hydroxy-Fettsäure überein. Weitere Fragmentationen befanden sich bei m/z 367 ($[M - CH_3CH_2]^+$), 337 ($[M - COOCH_3]^+$), 311 ($[HC(OTMS)CH=CHCH=CH(CH_2)_7COOCH_3]^+$), 306 ($[m/z$ 337 - $CH_3O]^+$), 239 ($[M - (CH_2)_7COOCH_3]^+$), 221 ($[m/z$ 311 - $Si(CH_3)_3OH]^+$), 157 ($[(CH_2)_7COOCH_3]^+$), 75 ($[(CH_3)_2SiOH]^+$) und 73 ($[(CH_3)_3Si]^+$). Die Übereinstimmung des Massenspektrums mit

dem in [35] beschriebenen führte zu der Identifizierung von Peak 7 als Methylester der 15,16-Epoxy-13-hydroxy-9Z,11E-octadecadiensäure (15,16-EHOD).

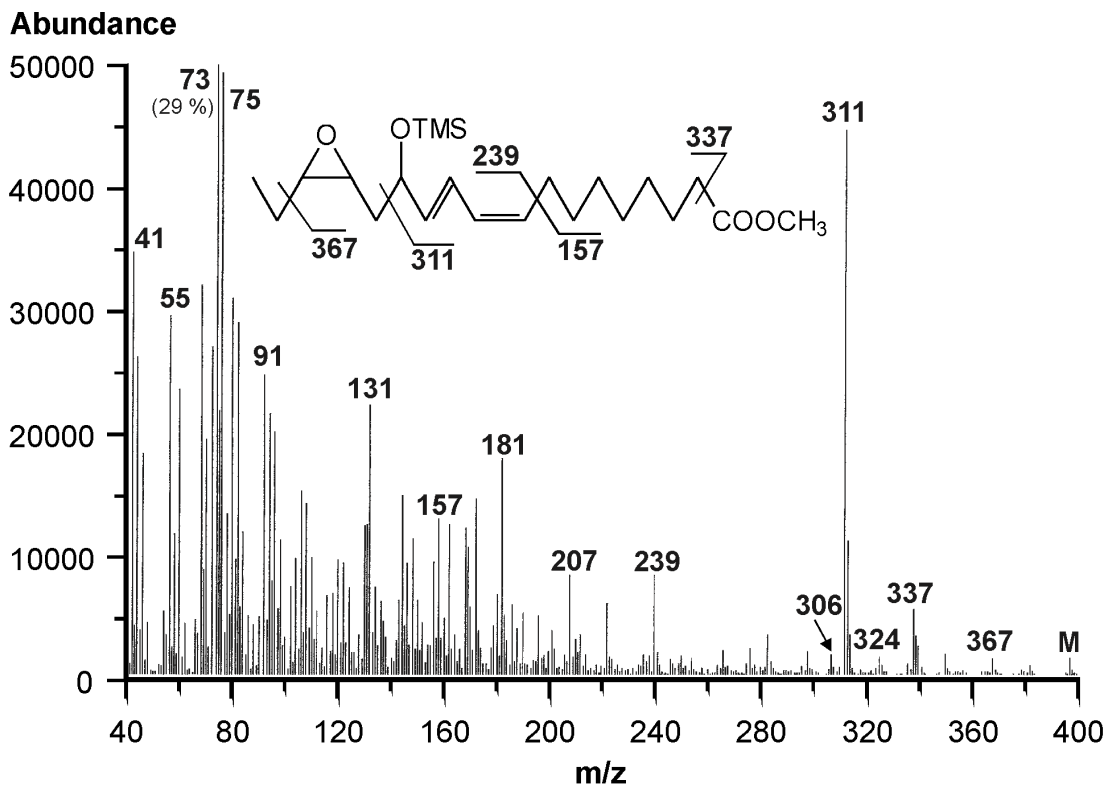


Abb. 2-77: GC-Massenspektrum (EI) des fraktionierten Peaks 7 nach Trimethylsilylierung.

Das Spektrum von **Peak 8** besaß ein für Ketole typisches Fragmentierungsmuster (Abb. 2-78). Wasser- bzw. Methanol-Abspaltung führte zu den Fragmentationen m/z 306 ($[M - H_2O]^+$), 293 ($[M - CH_3O]^+$) und 275 ($[M - H_2O - CH_3O]^+$). Infolge der Ionen m/z 187 ($[CHOH(CH_2)_7COOCH_3]^+$), 155 ($[m/z 187 - CH_3OH]^+$), 137 ($[m/z 155 - H_2O]^+$) wurde die Hydroxylgruppe dem C_9 zugeordnet. Die Fragmentationen m/z 111 ($[CH_3CH_2CH=CH(CH_2)_2CO]^+$), 223 ($[M - H_2O - CH_3CH_2CH=CH(CH_2)_2]^+$) und 209 ($[M - CH_3OH - CH_3CH_2CH=CH(CH_2)_2]^+$) wiesen auf eine am C_{12} lokalisierte Ketogruppe hin. Somit handelte es sich bei Peak 8 um den Methylester der 9-Hydroxy-12-oxo-10E,15Z-octadecadiensäure (9,12- γ -Ketol).

Bei der chemischen Ionisierung wurde ein Quasi-Molekülion $[M + H]^+$ von m/z 325 detektiert, was das Molekulargewicht des 9,12- γ -Ketols bestätigte (Abb. 2-79).

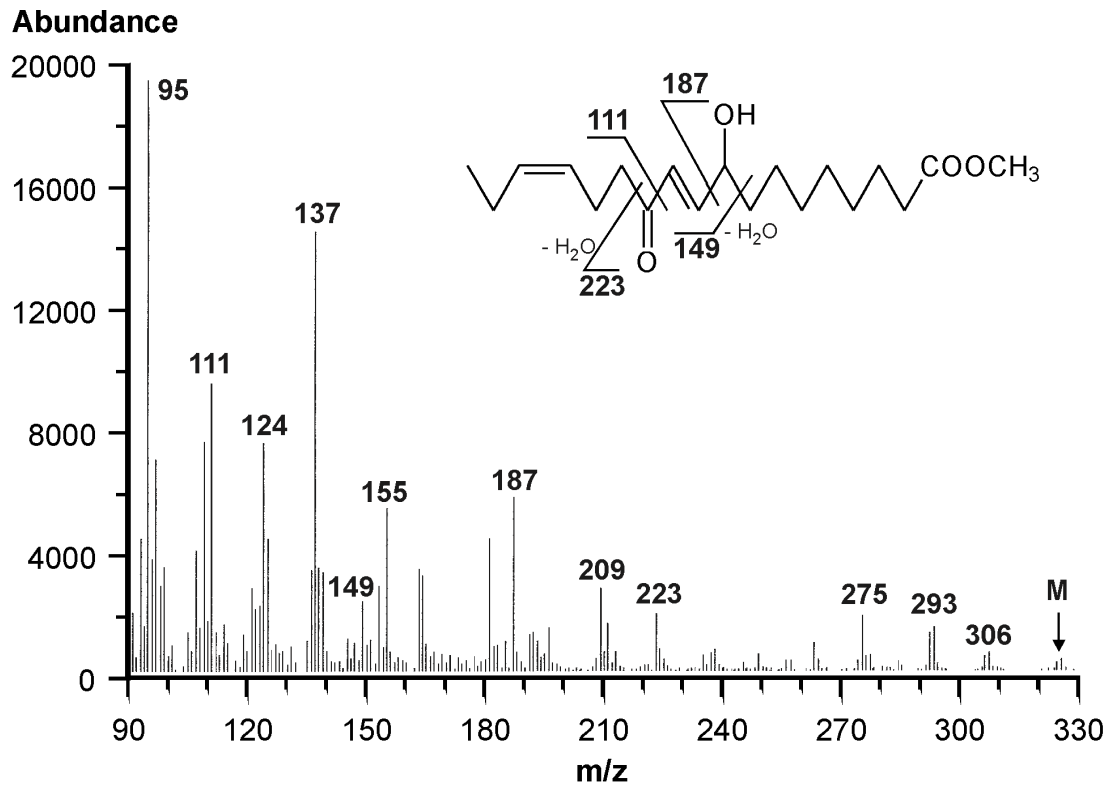


Abb. 2-78: PB-Massenspektrum (EI) von Peak 8: 9,12- γ -Ketol (Me).

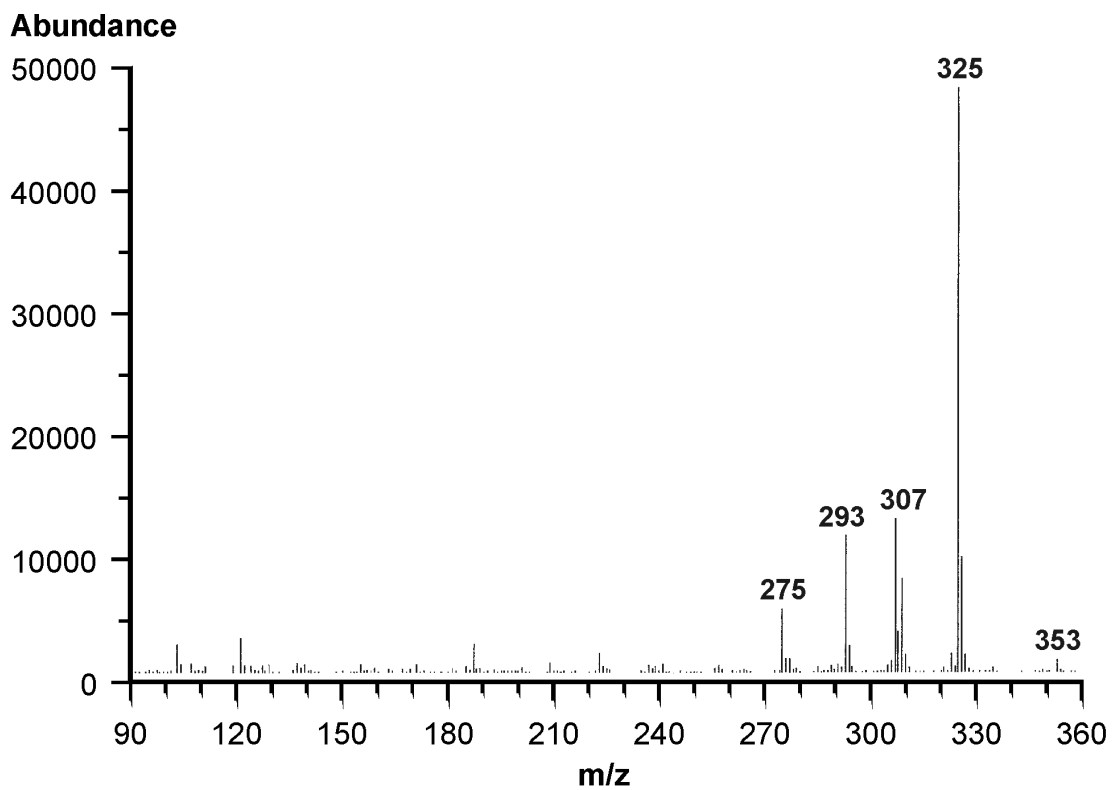


Abb. 2-79: PB-Massenspektrum (CI) von Peak 8: 9,12- γ -Ketol (Me).

Eine Übersicht über die mittels HPLC-PB-MS und GC-MS identifizierten Peaks (Methylester) zeigt Tab. 2-22. Die Numerierung der Peaks entspricht Abb. 2-67.

Tab. 2-22: Übersicht über die mittels HPLC-PB-MS und GC-MS identifizierten Peaks (Methylester).

Peak-Nr.	Verbindung	Abkürzung
1	2 <i>E</i> -Hexenal	---
2	12-Oxo-10 <i>E</i> -dodecensäure	---
3	12-Oxo-phytodiensäure	12-oxo-PDA
4	11-Hydroxy-12-oxo-9 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i> -octadecadiensäure	11,12- α -Ketol
5	12-Oxo-13-hydroxy-9 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i> -octadecadiensäure	12,13- α -Ketol
6	13-Hydroxy-9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> ,15 <i>Z</i> -octadecatriensäure	13-HOT
7	15,16-Epoxy-13-hydroxy-9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> -octadecadiensäure	15,16-EHOD
8	9-Hydroxy-12-oxo-10 <i>E</i> -15 <i>Z</i> -octadecadiensäure	9,12- γ -Ketol

2.11.3. Quantifizierung der Oxylipide mit dem ELSD

Die Quantifizierung der Oxylipide war dadurch erschwert, daß Referenzverbindungen nicht kommerziell erhältlich waren. Daher wurden zur Kalibrierung des ELSD Verbindungen ausgewählt, die in der Anzahl der Kohlenstoff-Atome und in wesentlichen Strukturelementen (Hydroxylgruppe, Doppelbindung, Ringstruktur) mit den Oxylipiden übereinstimmten. Ricinolsäuremethylester wurde zur Quantifizierung geradkettiger Oxylipide und *n*-Heptyljasmonat (vgl. 4.4.3.) für die Bestimmung des zyklischen 12-oxo-PDA-Methylesters verwendet (Abb. 2-80).

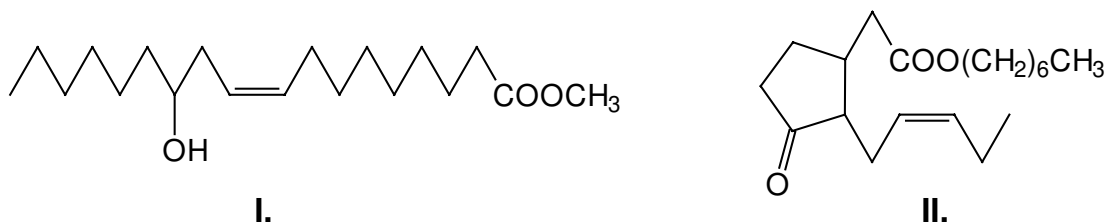


Abb. 2-80: Zur Kalibrierung des ELSD verwendete Verbindungen. I. Ricinolsäure (12-Hydroxy-9*Z*-octadecensäure)-Methylester, II. *n*-Heptyljasmonat.

Der lineare Bereich des ELSD war äußerst gering und hing stark von der gewählten Verstärkung (Gain) ab (Abb. 2-81). Mit dem verwendeten Gerät waren Einstellungen von 1 (unempfindlich) bis 12 (höchste Empfindlichkeit) möglich. Bei Gain 9 wurde im

untersuchten Konzentrationsbereich von 1,1 bis 52,6 mg L⁻¹ Ricinolsäuremethylester ein sigmoider Verlauf festgestellt, wobei mit den beiden höchsten Konzentrationen bereits der Vollausschlag des Detektorsignals (1 V) erreicht war. Wenn man diese Meßpunkte sowie den untersten Punkt bei der Berechnung der Eichgerade nicht berücksichtigte, ergab sich im Bereich von 5,3 bis 21,5 mg L⁻¹ eine annähernd lineare Beziehung zwischen Peakfläche und Konzentration.

Die Linearität ließ sich durch eine Abschwächung des Detektorsignals vergrößern. Bei Gain 8 war die Peakfläche der Konzentration im Bereich von 10,5 bis 52,6 mg L⁻¹ direkt proportional. In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde die Quantifizierung der Oxylipide bei Gain 8 vorgenommen. Auf eine weitere Vergrößerung des Linearitätsbereiches durch Wahl einer noch geringeren Einstellung wurde aufgrund des Empfindlichkeitsverlustes verzichtet.

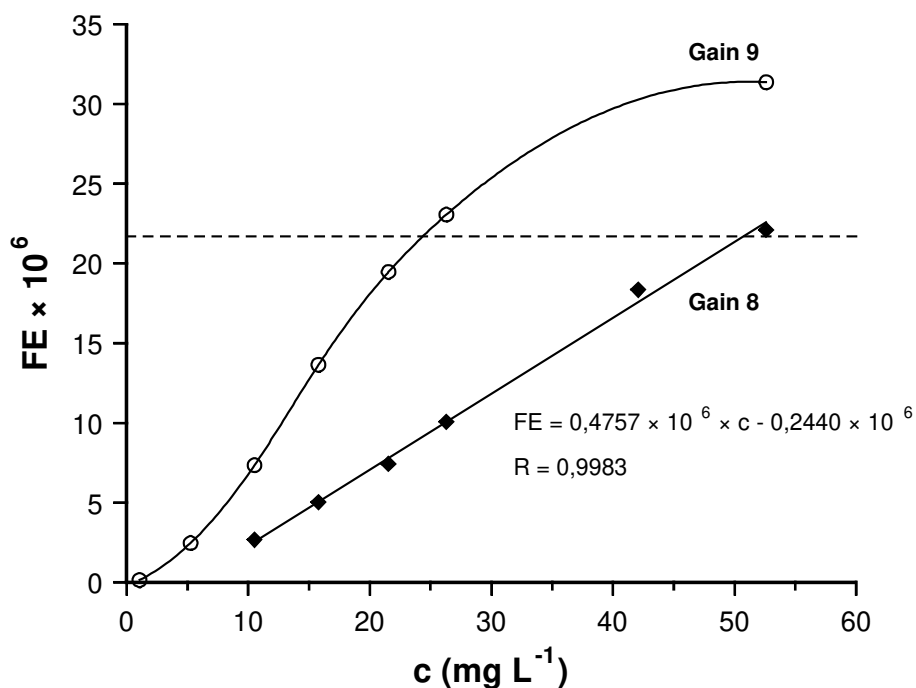


Abb. 2-81: Detektor-Response für Ricinolsäuremethylester bei unterschiedlicher Verstärkung (Gain) des Signals. HPLC System 2. Die horizontale Linie (- - -) stellt den Vollausschlag des Detektors (1 Volt) dar. FE: Flächeneinheiten des integrierten Peaks.

Um die Annahme zu überprüfen, daß strukturell ähnliche Substanzen ein vergleichbares Detektorsignal ergeben, wurde eine Eichgerade mit dem methylierten Substrat (13-HPOT-Me) erstellt und den Eichgeraden der beiden zur Kalibrierung verwendeten Verbindungen gegenübergestellt. Die Konzentration von 13-HPOT in der Stammlösung

wurde zuvor photometrisch ermittelt. Abb. 2-82 zeigt die Eichgeraden in einfacher Auftragung, Abb. 2-83 in doppelt logarithmischer Auftragung.

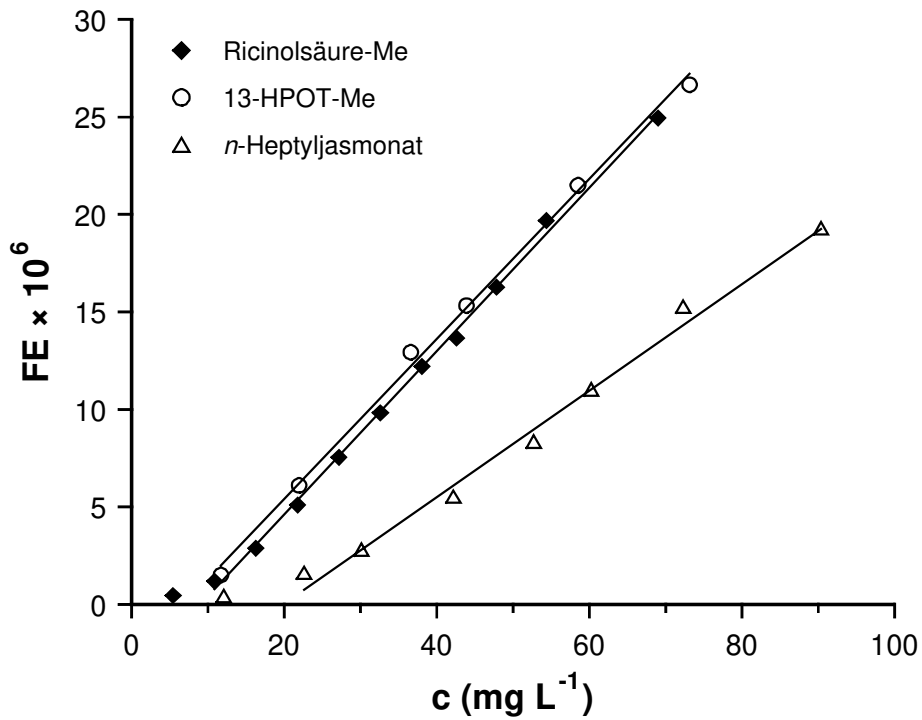


Abb. 2-82: Vergleich der Eichgeraden von Ricinolsäuremethylester, 13-HPOT-Methylester und *n*-Heptyljasmonat. HPLC-System 2, ELSD: Gain: 8.

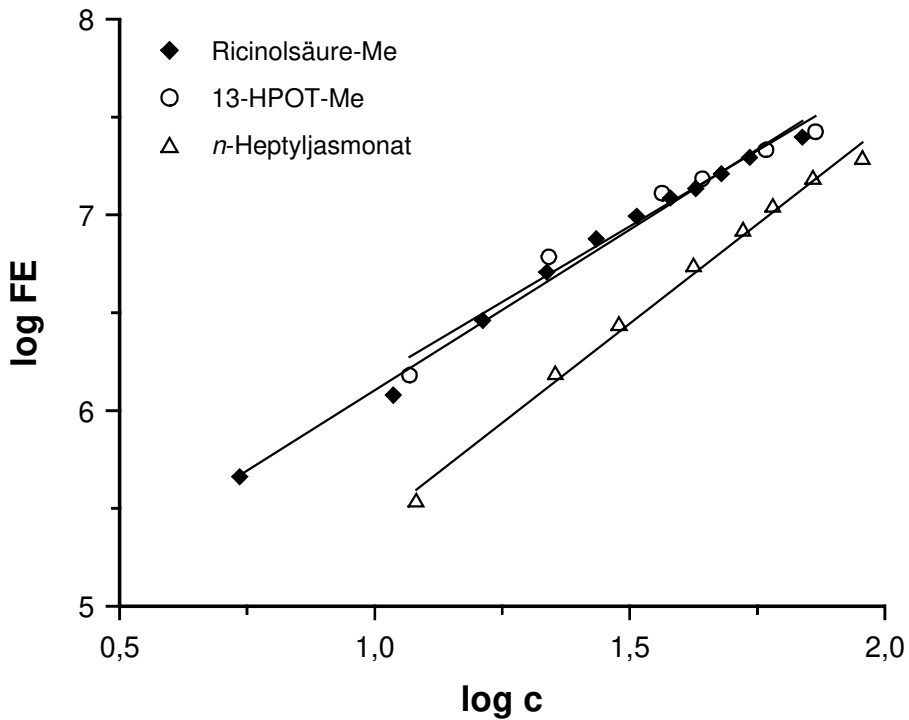


Abb. 2-83: Vergleich der Eichgeraden von Ricinolsäuremethylester, 13-HPOT-Methylester und *n*-Heptyljasmonat in doppelt-logarithmischer Auftragung.

Die Geradengleichungen von Ricinolsäure-Me und 13-HPOT-Me, die strukturell viele Gemeinsamkeiten aufweisen, stimmten im Gegensatz zum zyklischen *n*-Heptyljasmomat relativ gut überein (Tab. 2-23).

Tab. 2-23: Vergleich der ELSD-Eichgeraden.

Auftragung	Verbindung	Gleichung	R
einfach	Ricinolsäure-Me	$FE = 0,4193 \times 10^6 \times c - 3,78 \times 10^6$	0,999
	13-HPOT-Me	$FE = 0,4105 \times 10^6 \times c - 2,80 \times 10^6$	0,998
	<i>n</i> -Heptyljasmomat	$FE = 0,2729 \times 10^6 \times c - 5,41 \times 10^6$	0,995
doppelt logarithmisch	Ricinolsäure-Me	$\log FE = 1,6396 \times \log c + 4,4647$	0,996
	13-HPOT-Me	$\log FE = 1,5453 \times \log c + 4,6225$	0,986
	<i>n</i> -Heptyljasmomat	$\log FE = 2,0277 \times \log c + 3,4043$	0,997

Der *Linearitätsbereich* des ELSD war äußerst gering, was ein sorgfältiges Einstellen der Analytkonzentration erforderte. In einfacher Auftragung erstreckte sich dieser von ca. 10 bis 73 mg L⁻¹ (Ricinolsäure-Me, 13-HPOT-Me) bzw. von 20 bis 90 mg L⁻¹ (*n*-Heptyljasmomat). Bei geringeren Konzentrationen nahm die Steigung deutlich ab, woraus ein Abflachen der Kurve resultierte. Im Vergleich dazu wurden in doppelt logarithmischer Auftragung auch die Eichpunkte, die sich in einfacher Auftragung außerhalb des Linearitätsbereiches befanden, von der Kalibrationsgeraden erfaßt (Abb. 2-83).

Die Abweichung der Geradengleichung von Ricinolsäure-Me von der in Abb. 2-81 dargestellten resultierte vermutlich daher, daß letztere einige Wochen zuvor erstellt wurde. Der ELSD konnte in diesem Zeitraum an Empfindlichkeit verloren haben (z. B. Verringerung der Lampenintensität durch den ständigen Betrieb).

Die *Nachweisgrenzen* für die absolut auf die Säule aufgegebene Substanzmenge (Injektionsvolumen: 20 µL) waren ca. 50 ng (Ricinolsäure-Me) und 100 ng (*n*-Heptyljasmomat).

2.12. Einfluß verschiedener Parameter auf den Metabolismus von 13-HPOT in Rohextrakten aus Mungbohnenkeimlingen

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluß verschiedener Parameter (Triton X-100, Inkubationstemperatur, Substratkonzentration, Zusatz von Ascorbinsäure) auf den Metabolismus von 13-HPOT in Rohextrakten untersucht. Die Quantifizierung sowohl nichtflüchtiger als auch flüchtiger Produkte erfolgte mittels HPLC bzw. GC. Nach Extraktion der Reaktionsansätze wurde der organische Extrakt geteilt. Ein Aliquot wurde unter Vakuum bei 30 °C eingeengt, was die thermische Belastung der Probe auf ein Minimum reduzierte, methyliert und anschließend mit der HPLC untersucht. Das zweite Aliquot wurde bei 40 °C unter Verwendung einer Vigreux-Kolonnen aufkonzentriert und direkt zur gaschromatographischen Bestimmung von 2*E*-Hexenal verwendet (vgl. 4.9.).

2.12.1. Einfluß von Triton X-100

Rohextrakte, die ohne Zusatz eines Detergenz hergestellt worden waren, zeigten in früheren Versuchen eine verringerte Konzentration an 2*E*-Hexenal (vgl. 2.5.1.). Es sollte nun geprüft werden, ob in den Reaktionsansätzen noch Substrat vorlag oder ob anstelle von 2*E*-Hexenal andere Metabolite vermehrt gebildet wurden.

Hierzu wurden ein mit bzw. ohne 0,1 % Triton X-100 hergestellter Rohextrakt aus 5 g Keimlingen mit 55,82 µmol 13-HPOT 1 h inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 50 mL frisch hergestellter Rohextrakt aus 5 g Keimlingen (mit/ohne Triton X-100) bzw. 50 mL Inkubationspuffer (Vergleich zur Berücksichtigung der Verdünnung) zugesetzt und die Inkubation eine weitere Stunde fortgesetzt. Durch den erneuten Zusatz von Rohextrakt sollte evtl. nicht umgesetztes Substrat metabolisiert werden. Bei der Berechnung der Umsatzraten wurden die jeweiligen Blindwerte (Rohextrakt ohne 13-HPOT) berücksichtigt.

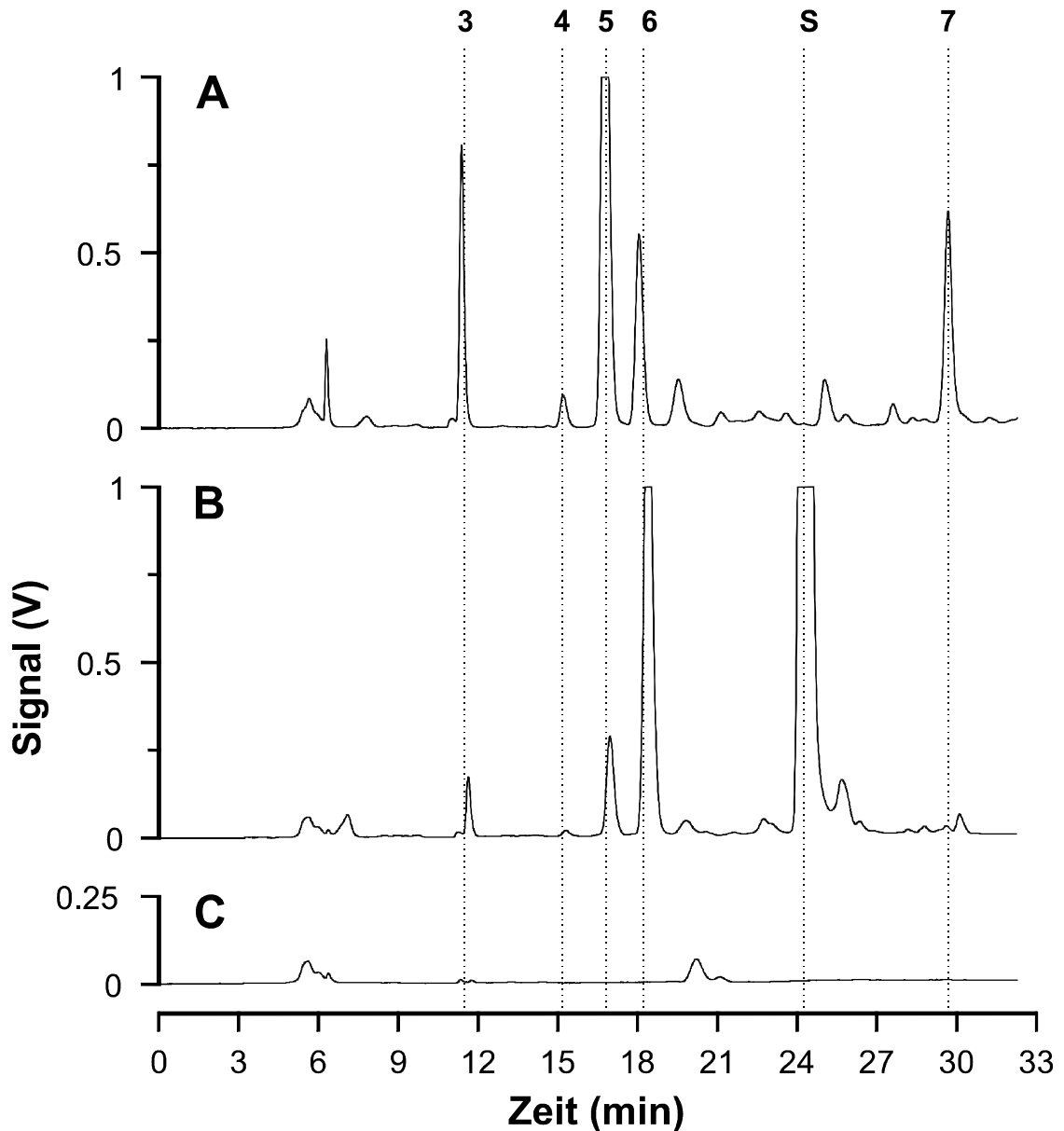


Abb. 2-84: HPLC-ELSD-Analytik: Einfluß von Triton X-100 auf den Metabolismus von 13-HPOT. A: Rohextrakt (Triton) + 13-HPOT, B: Rohextrakt (ohne Triton) + 13-HPOT, C: Blindwert (Rohextrakt ohne 13-HPOT). Numerierung der Peaks: vgl. Tab. 2-22. S: Substrat.

Triton X-100 beeinflusste nicht nur die Bildung von 2E-Hexenal, sondern auch die der Oxylipide (Abb. 2-84). So war der Anteil der Oxylipide (Summe) am 13-HPOT-Metabolismus in Gegenwart von 0,1 % Triton X-100 mit 12,7 % maximal, wobei das 12,13- α -Ketol mit 6 % das Hauptprodukt war (Tab. 2-24). Unter diesen Bedingungen war nach Ablauf der Inkubationszeit kein Substrat mehr nachweisbar. In dem ohne Triton X-100 hergestellten Rohextrakt war sowohl der Anteil von 2E-Hexenal (14,5 %) als auch der Oxylipide (7,2 %) deutlich erniedrigt. Nach insgesamt 2 h Inkubation lagen noch 38,1 % des Substrates unverändert vor.

Tab. 2-24: Einfluß von Triton X-100 auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 50 mL Puffer. Rohextrakt aus 5 g Keimlingen. Inkubationsbedingungen: 13-HPOT: 55,82 µmol, pH: 6,5, T: RT, V_{gesamt} : 2 × 50 mL, $Zeit_{\text{gesamt}}$: 2 × 1 h.

Metabolit	0,1 % Triton X-100		ohne Triton X-100	
	Gehalt (µmol)	Anteil (%)	Gehalt (µmol)	Anteil (%)
2E-Hexenal	22,6	40,5	8,1	14,5
12-oxo-PDA	1,1	2,0	0,4	0,7
12,13-α-Ketol	3,4	6,0	0,7	1,2
13-HOT	1,2	2,2	3,0	5,3
13-HPOT	---	---	21,3	38,1
15,16-EHOD	1,4	2,5	---	---

Tab. 2-25: Einfluß von Triton X-100 auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 50 mL Rohextrakt. Rohextrakt aus 2 × 5 g Keimlingen. Inkubationsbedingungen: 13-HPOT: 55,82 µmol, pH: 6,5, T: RT, V_{gesamt} : 2 × 50 mL, $Zeit_{\text{gesamt}}$: 2 × 1 h.

Metabolit	0,1 % Triton X-100		ohne Triton X-100	
	Gehalt (µmol)	Anteil (%)	Gehalt (µmol)	Anteil (%)
2E-Hexenal	21,4	38,3	29,3	52,5
12-oxo-PDA	1,5	2,7	0,7	1,3
12,13-α-Ketol	2,0	3,6	1,6	2,8
13-HOT	1,6	2,9	1,0	1,8
13-HPOT	---	---	---	---
15,16-EHOD	1,5	2,6	---	---

Wurden dagegen nach 1 h 50 mL frischer Rohextrakt zugesetzt und die Reaktionsansätze eine weitere Stunde inkubiert, so konnte kein Substrat mehr nachgewiesen werden (Tab. 2-25). Offensichtlich wurde das nach 1 h noch vorliegende Substrat (vgl. Tab. 2-24) durch den frischen Rohextrakt zu 2E-Hexenal gespalten. In dem Tritonhaltigen Rohextrakt zeigte sich erwartungsgemäß keine Veränderung, da dieser bereits nach 1 h kein Substrat mehr enthielt. Der Anteil der Oxylipide lag bei 11,8 % (mit Triton) bzw. 5,9 % (ohne Triton). Interessant war, daß unter diesen Versuchsbedingungen in dem ohne Triton hergestellten Rohextrakt mit 52,5 % erheblich mehr 2E-Hexenal

gebildet wurde. Daher wurde in den nächsten Experimenten die Kombination von einem erneuten Rohextrakt-Zusatz und einem Verzicht auf Triton X-100 beibehalten.

2.12.2. Einfluß der Inkubationstemperatur

Rohextrakte (ohne Triton X-100) aus 5 g Keimlingen wurden mit 52,95 µmol 13-HPOT bei Raumtemperatur (25 °C) und in einem Eisbad (0 °C) 1 h inkubiert. Anschließend wurden 50 mL frischer Rohextrakt (ohne Triton X-100) bzw. 50 mL Inkubationspuffer zugesetzt und eine weitere Stunde inkubiert. Dieser Zusatz wurde noch einmal wiederholt, so daß die gesamte Inkubationszeit 3 h betrug. Bei der Berechnung der Umsatzraten wurden die jeweiligen Blindwerte (Rohextrakte ohne 13-HPOT) berücksichtigt.

In Rohextrakten, denen nur Puffer zugesetzt worden war, wurde bei 0 °C ca. 20 % weniger 2E-Hexenal gebildet als bei 25 °C (Tab. 2-26). Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte bei 0 °C und in geringerem Ausmaß auch bei 25 °C noch Substrat nachgewiesen werden. Die Bildung der Oxylipide erfolgte bei beiden Temperaturen zu einem geringen Anteil von insgesamt < 7 %.

Tab. 2-26: Einfluß der Inkubationstemperatur auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 2 × 50 mL Puffer. Rohextrakt (ohne Triton) aus 5 g Keimlingen. Inkubationsbedingungen: 13-HPOT: 52,95 µmol, pH: 6,5, V_{gesamt}: 3 × 50 mL, Zeit_{gesamt}: 3 × 1 h.

Metabolit	0 °C		25 °C	
	Gehalt (µmol)	Anteil (%)	Gehalt (µmol)	Anteil (%)
2E-Hexenal	19,3	36,5	24,2	45,7
12-oxo-PDA	---	---	0,6	1,0
12,13-α-Ketol	1,4	2,7	1,2	2,2
13-HOT	1,6	2,9	1,8	3,3
13-HPOT	7,0	13,2	3,0	5,7

Durch den zweifachen Zusatz von jeweils 50 mL frischem Rohextrakt konnte das in obigen Proben noch vorliegende Substrat umgesetzt werden (Tab. 2-27). Dadurch stieg der Anteil des 2E-Hexenals am Metabolismus von 13-HPOT auf 53,8 % (0 °C) bzw. 48,0 % (25 °C).

Tab. 2-27: Einfluß der Inkubationstemperatur auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 2 × 50 mL Rohextrakt. Rohextrakt (ohne Triton) aus 3 × 5 g Keimlingen. Inkubationsbedingungen: 13-HPOT: 52,95 µmol, pH: 6,5, V_{gesamt} : 3 × 50 mL, $\text{Zeit}_{\text{gesamt}}$: 3 × 1 h.

Metabolit	0 °C		RT	
	Gehalt (µmol)	Anteil (%)	Gehalt (µmol)	Anteil (%)
2E-Hexenal	28,5	53,8	25,4	48,0
12-oxo-PDA	0,9	1,6	0,8	1,6
12,13-α-Ketol	2,4	4,6	0,5	1,0
13-HOT	1,1	2,1	1,1	2,0
13-HPOT	---	---	---	---

2.12.3. Einfluß der Substratkonzentration

In Versuch 2.4.4. wurde bei der Inkubation von Homogenaten mit abnehmender Substratkonzentration eine Zunahme der Umsatzrate von 13-HPOT zu 2E-Hexenal festgestellt.

Es wurde nun versucht, durch eine Vergrößerung des Inkubationsvolumens und eine Verringerung der Substratmenge eine weitere Steigerung des Umsatz zu 2E-Hexenal zu erzielen. Rohextrakte (ohne Triton X-100) aus 5 g Keimlingen wurden mit 21,38 µmol bzw. 42,75 µmol 13-HPOT 1 h bei 0 °C inkubiert. Zum Zeitpunkt der Substratzugabe betrug das Volumen des Reaktionsansatzes 150 mL anstatt der unter Standardbedingungen verwendeten 50 mL (vgl. 4.6.2., 4.6.3.). Nach 1 h wurden 50 mL frischer Rohextrakt bzw. 50 mL Puffer zugesetzt und weitere 1,5 h inkubiert. Bei der Berechnung der Umsatzraten wurden die jeweiligen Blindwerte (Rohextrakte ohne 13-HPOT) berücksichtigt.

In diesem Versuch wurde für 2E-Hexenal die bislang höchste Umsatzrate erreicht (Tab. 2-28). Diese betrug bei 21,38 µmol 13-HPOT 86,3 % und verringerte sich, wie auch schon in Versuch 2.4.4. beobachtet, bei einer Erhöhung der Substratkonzentration. Oxylipide konnten nur bei der Substratmenge von 42,75 µmol detektiert werden, wobei ihr Anteil < 4 % war.

Tab. 2-28: Einfluß der Substratkonzentration auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 50 mL Puffer. Rohextrakt (ohne Triton) aus 5 g Keimlingen. Inkubationsbedingungen: T: 0 °C, pH: 6,5, V_{gesamt} : 150 + 50 mL, $\text{Zeit}_{\text{gesamt}}$: 1 + 1,5 h.

Metabolit	21,38 µmol 13-HPOT		42,75 µmol 13-HPOT	
	Gehalt (µmol)	Anteil (%)	Gehalt (µmol)	Anteil (%)
2E-Hexenal	18,4	86,3	30,8	72,1
12-oxo-PDA	---	---	< 0,4	< 0,9
12,13-α-Ketol	---	---	0,9	2,1
13-HOT	---	---	< 0,4	< 0,9
13-HPOT	---	---	---	---

Da sich in den Reaktionsansätzen, denen nach 1 h 50 mL Puffer zugesetzt worden war, kein Substrat mehr befand (vgl. Tab. 2-28), traten nach Zugabe von frischem Rohextrakt keine signifikanten Veränderungen auf (Tab. 2-29). Mit Umsatzraten des Substrates zu 2E-Hexenal von **87,4 %** bzw. 70,2 % wurde das mit den beiden anderen Proben erhaltene Resultat bestätigt.

Tab. 2-29: Einfluß der Substratkonzentration auf den Metabolismus von 13-HPOT: Zusatz von 50 mL Rohextrakt. Rohextrakt (ohne Triton) aus 2 × 5 g Keimlingen. Inkubationsbedingungen: T: 0 °C, pH: 6,5, V_{gesamt} : 150 + 50 mL, $\text{Zeit}_{\text{gesamt}}$: 1 + 1,5 h.

Metabolit	21,38 µmol 13-HPOT		42,75 µmol 13-HPOT	
	Gehalt (µmol)	Anteil (%)	Gehalt (µmol)	Anteil (%)
2E-Hexenal	18,7	87,4	30,0	70,2
12-oxo-PDA	---	---	< 0,4	< 0,9
12,13-α-Ketol	---	---	0,7	1,5
13-HOT	---	---	< 0,4	< 0,9
13-HPOT	---	---	---	---

2.12.4. Einfluß von Ascorbinsäure

Im Verlauf der „enzymatischen Bräunung“ bilden Phenoloxidasen Reaktionsprodukte, die Enzyme durch Komplexbildung inhibieren können. Die Bildung dieser Produkte läßt sich u. a. durch einen Zusatz von Reduktionsmitteln wie beispielsweise Ascorbinsäure verhindern.

Während der Inkubation der Homogenate und Rohextrakte wurde eine zunehmende Braunfärbung beobachtet. Ob dadurch die Aktivität der Hydroperoxid-Lyase negativ beeinflußt wurde, sollte mit einem Zusatz von 10 mM und 25 mM Ascorbinsäure zum verwendeten Puffer geprüft werden. Die Inkubation der Rohextrakte (ohne Triton X-100) aus 5 g Keimlingen mit 43,08 µmol 13-HPOT erfolgte bei 0 °C in einem Volumen von 150 mL. Nach 1 h wurden den Reaktionsansätzen 50 mL frischer Rohextrakt zugesetzt und die Inkubation 1,5 h fortgesetzt. Die nach Subtraktion der jeweiligen Blindwerte (Rohextrakte ohne 13-HPOT) erhaltenen Werte sind in Tab. 2-30 zusammengefaßt.

Tab. 2-30: Einfluß von Ascorbinsäure auf den Metabolismus von 13-HPOT. Rohextrakt (ohne Triton) aus 2 × 5 g Keimlingen. Inkubationsbedingungen: 13-HPOT: 43,08 µmol, T: 0 °C, pH: 6,5, V_{gesamt}: 150 + 50 mL, Zeit_{gesamt}: 1 + 1,5 h.

Metabolit	0 mM Ascorbin- säure		10 mM Ascorbin- säure		25 mM Ascorbin- säure	
	Gehalt (µmol)	Anteil (%)	Gehalt (µmol)	Anteil (%)	Gehalt (µmol)	Anteil (%)
2E-Hexenal	27,6	64,2	28,7	66,5	28,4	66,0
12-oxo-PDA	< 0,4	< 0,9	0,5	1,2	0,4	1,0
12,13-α-Ketol	1,0	2,3	2,1	5,0	1,9	4,4
13-HOT	< 0,4	< 0,9	1,2	2,8	1,2	2,7
13-HPOT	---	---	---	---	---	---

In Gegenwart von 10 mM und 25 mM Ascorbinsäure wurde die braune Verfärbung der Rohextrakte fast vollständig unterdrückt. Allerdings wurde im Vergleich zu einem Rohextrakt, der keine Ascorbinsäure enthielt, nur geringfügig mehr 2E-Hexenal gebildet, so daß eine Inaktivierung der Hydroperoxid-Lyase durch diese Produkte offensichtlich nicht in Frage kam. Der Anteil von 13-HOT und 12,13-α-Ketol in den Ascorbinsäurehaltigen Rohextrakten war dagegen deutlich erhöht.

2.13. Metabolismus von 13-HPOT in unterschiedlichen Gemüsesorten

Die entwickelte HPLC-Methodik wurde zur Analytik der Oxylipide in drei Gemüsesorten angewendet (vgl. 4.6.3.). Hierbei traten pflanzenspezifische Unterschiede auf (Abb. 2-85). Während in einem Rohextrakt aus Auberginen deutlich mehr 12-oxo-PDA als 12,13- α -Ketol gebildet wurde, war bei Tomaten das Verhältnis der Peaks umgekehrt. In Kartoffeln war kein 12,13- α -Ketol feststellbar, wohl aber eine ausgeprägte Bildung von 12-oxo-PDA.

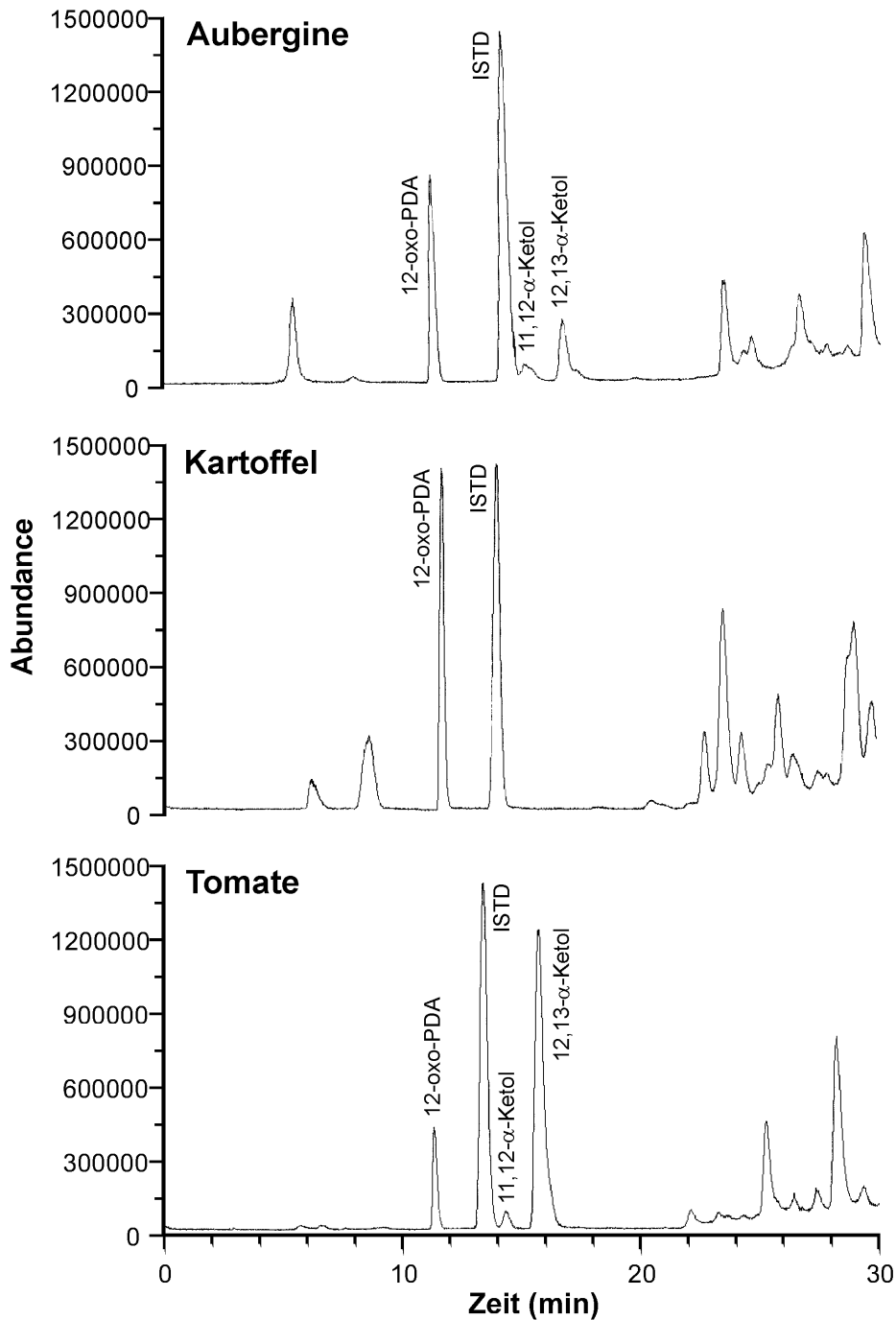


Abb. 2-85: HPLC-PB-MS-Analytik der Oxylipide in unterschiedlichen Gemüsesorten nach Zusatz von 13-HPOT. ISTD: Ricinolsäuremethylester.

3. Diskussion

3.1. Der Lipoxygenase-Weg - Bildung bioaktiver C₆- und C₉-Verbindungen durch Pflanzen

3.1.1. Pflanzenphysiologische Bedeutung

Die Produkte des Lipoxygenase-Weges üben vielfältige physiologische Funktionen aus und sind quasi die chemische Antwort der Pflanze auf eine Verletzung des Gewebes [3]. Vor allem die Wirkung der Metabolite auf phytopathogene Pilze und Bakterien ist Gegenstand zahlreicher Veröffentlichungen (Tab. 3-1). Mit der Emission von Alkenalen, Alkanalen und deren korrespondierenden Alkoholen hat die Pflanze einen wirkungsvollen Schutzmechanismus gegenüber Feinden entwickelt und verfügt somit über natürliche Fungizide bzw. Bakterizide. Diese chemischen Interaktionen zwischen Pflanzen und anderen Organismen wie z. B. Mikroorganismen oder Insekten, aber auch unter den Pflanzenspezies, die Einfluß auf das Wachstum oder sonstige Funktionen haben, werden mit dem Begriff „Allelopathie“ beschrieben [41].

Untersuchungen zur Beziehung zwischen Strukturelementen und der Wirkung von aliphatischen Aldehyden und Alkoholen (u. a. auch C₆ und C₉) auf Mikroorganismen ergaben, daß eine Doppelbindung in α,β -Stellung zu der Carbonylgruppe die fungizide Aktivität der Verbindung erhöht [42, 43]. Im Vergleich zu den Alkoholen zeigten die Aldehyde ein höheres inhibierendes Potential. Als Ursache für den toxischen Effekt der Aldehyde wurde die Reaktion des positivierten Carbonylkohlenstoffs mit Nucleophilen angenommen, die zu Addukten mit Proteinen oder der DNA führen kann [42].

Neben einer fungiziden und bakteriziden Wirkung konnte auch eine Hemmung der Keimfähigkeit bei Pflanzen festgestellt werden. So wurde die Keimung von Sojasamen [44], Apfelpollen [45] und von Zwiebeln, Karotten sowie Tomaten [46] durch C₆- und C₉-Aldehyde in unterschiedlichem Ausmaß inhibiert.

Weiterhin fungieren die flüchtigen Produkte des Lipoxygenase-Weges als Signalstoffe für Insekten, die mit Hilfe von olfaktorischen Chemorezeptoren an den Antennen die von der Pflanze emittierten Substanzen empfangen. Diese werden von dem Insekt zur Orientierung im Flug oder bei der Eiablage genutzt [47] und können Insekten sowohl anlocken als auch vertreiben [48, 49].

Tab. 3-1: Physiologische Eigenschaften einiger Produkte des Lipoxygenase-Weges.

Verbindung	Bioaktivität	Literatur
Hexanal	fungizid, bakterizid, Inhibierung der Keimung von pflanzl. Samen, Reduktion der Blattlausvermehrung	[42, 50, 51, 52, 46, 44, 53]
3Z-Hexenal	fungizid	[54]
2E-Hexenal	fungizid, bakterizid, Inhibierung der Keimung von pflanzl. Samen, Reduktion der Blattlausvermehrung	[42, 51, 52, 54, 50, 55, 46, 44, 53]
3Z-Nonenal	fungizid	[54]
2E-Nonenal	fungizid, Inhibierung der Keimung von pflanzl. Samen	[42, 46, 51, 52, 54, 44]
2E,6Z-Nonadienal	fungizid	[42]
Hexanol	fungizid, bakterizid, Reduktion der Blattlausvermehrung	[42, 50, 53]
3Z-Hexenol	fungizid, bakterizid, Reduktion der Blattlausvermehrung	[42, 55, 53]
2E-Hexenol	fungizid, bakterizid, Reduktion der Blattlausvermehrung	[42, 50]
12-Oxo-10E-dodecensäure	Wundhormon	[56]

Das nichtflüchtige Spaltprodukt 12-Oxo-10E-dodecensäure, das früher als Traumatol bezeichnet wurde, ist ebenfalls physiologisch aktiv [56]. Es fungiert in der Pflanze als sogenanntes Wundhormon. Durch eine stimulierende Wirkung auf die Zellteilung verursacht 12-Oxo-10E-dodecensäure die Bildung eines schützenden Callus um das verletzte Pflanzengewebe. 2E-Dodecensäure (Traumatinsäure), die durch Autooxidation von 12-Oxo-10E-dodecensäure entsteht, weist ebenfalls wundheilende Eigenschaften auf [56]. Für 9-Oxo-nonansäure konnte eine ähnliche Funktion bislang nicht nachgewiesen werden [2].

3.1.2. Sensorische Eigenschaften der flüchtigen Produkte

Für den Menschen stehen jedoch nicht so sehr die pflanzenphysiologischen, sondern vielmehr die sensorischen Eigenschaften im Vordergrund. So ist der Lipoxygenase-Weg einer der bedeutendsten enzymatischen Biogenesewege, der zur Aromabildung

in pflanzlichen Lebensmitteln maßgeblich beiträgt [9, 10]. Die in seinem Verlauf generierten flüchtigen Verbindungen werden zu den sekundären Aromastoffen gezählt, da sie erst bei der Zerkleinerung des Lebensmittels in Gegenwart von Luftsauerstoff entstehen [57, 58]. Infolge ihrer Geruchseigenschaften und niedrigen Schwellenwerte sind sowohl die C₆- als auch die C₉-Verbindungen von großem Interesse für die Aromenindustrie (Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Sensorische Eigenschaften einiger C₆- und C₉-Verbindungen.

Verbindung	Geruchsschwellenwert in H ₂ O (ppb)	Geruchseindruck	Literatur
Hexanal	4,5-5	fettig, grün, grasig, fruchtig	[59, 60, 11]
3Z-Hexenal	0,25	grün	[59]
2E-Hexenal	17	grün, stechend, fruchtig, nach Blättern	[59, 60, 11]
Hexanol	500	grün, ölig	[59, 60, 11]
3Z-Hexenol	70	frisch, grün, grasig	[59, 60, 11]
2E-Hexenol	k. A.	grün, fruchtig	[11]
2E-Nonenal	0,08	fettig	[59, 60]
2E,6Z-Nonadienal	0,01	grün, nach Gurke	[59]

k. A.: keine Angabe

Während die C₉-Verbindungen einen gurkenähnlichen Geruch besitzen, erinnert der Geruch der C₆-Verbindungen vor allem an frisch gemähtes Gras. Diesem frischen, grün-grasigen Aroma verdankt die Gruppe der C₆-Verbindungen (3Z-, 2E-Hexenal, Hexanal, 3Z-, 2E-Hexenol, Hexanol) auch die Trivialnamen „grüne Aromaten“ oder „Grünnoten“. Für 2E-Hexenal und 3Z-Hexenol existieren auch die Bezeichnungen „Blätteraldehyd“ bzw. „Blätteralkohol“, die sich aus ihrem blattähnlichen Geruch und aus dem Ort ihrer Entdeckung ableiten [6, 61]. CURTIUS und FRANZEN gelang im Jahr 1912 die Isolierung einer bis zu dem Zeitpunkt als „Blätteraldehyd“ benannten Verbindung aus ca. 600 kg Hainbuchenblättern, und sie konnten deren Struktur als 2E-Hexenal aufklären [61].

Im Gegensatz zu 2E,6Z-Nonadienal, das als „character impact component“ das Aroma von Gurken determiniert, handelt es sich bei den C₆-Verbindungen um Aromastoffe, die nur einen Teil des Gesamtaromas ausmachen, aber dennoch für das Aroma vieler

Obst- und Gemüsesorten unverzichtbar sind. In Kompositionen für Apfel-, Erdbeer-, Heidelbeer-, Himbeer-, Gurken- und Tomaten-Aromen sorgen die C₆-Verbindungen für eine frische grüne Topnote [62].

3.1.3. Vorkommen und Eigenschaften pflanzlicher Lipoxygenasen und Hydroperoxid-Lyasen

Lipoxygenasen und Hydroperoxid-Lyasen sind in Pflanzen weit verbreitet [2, 5, 16, 63]. Häufig werden in einer Pflanzenart auch mehrere Isoenzyme exprimiert, die sich in ihrer Regiospezifität unterscheiden können. Während bereits zahlreiche Isoenzyme der Lipoxygenase aus Soja [23], Gerste [64], Mais [65] und anderen Pflanzen [66] isoliert und charakterisiert wurden, konnten erst zwei Isoenzyme der Hydroperoxid-Lyase in Teeblättern [67] und grünen Paprika [27] nachgewiesen werden.

Lipoxygenase

Bei Lipoxygenasen handelt es sich um Dioxygenasen, die nicht-Häm gebundenes Eisen im aktiven Zentrum enthalten. Sie katalysieren die Peroxidierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit einem 1Z,4Z-Pentadien-System [2]. In Abhängigkeit von der Regiospezifität der Lipoxygenase in der jeweiligen Pflanzenart werden entweder fast ausschließlich 13-Hydroperoxide, 9-Hydroperoxide oder ein Gemisch beide Isomere in unterschiedlichen Anteilen gebildet (Tab. 3-3). Es wird angenommen, daß die Ursache hierfür in der Anordnung des Fettsäuremoleküls im aktiven Zentrum liegt (Abb. 3-1) [1, 66]. Während bei einigen Lipoxygenasen die Erkennung und Bindung der Carboxylgruppe bzw. des Alkylrestes im aktiven Zentrum strikt vorgegeben zu sein scheint, wird offensichtlich bei anderen Lipoxygenasen die Fettsäure in beiden möglichen Orientierungen angeordnet, was eine Verringerung der Regiospezifität bewirkt. Das Verhältnis der Hydroperoxid-Isomere kann durch den pH-Wert stark beeinflusst werden, was bei der Lipoxygenase-1 aus Soja besonders ausführlich untersucht wurde [21, 22, 24, 68]. Im Zuge der Katalyse erfolgt die Abstraktion des Protons und die Insertion des Sauerstoffs von entgegengesetzten Seiten.

Lipoxygenasen, die überwiegend 13-Hydroperoxide bilden, finden sich in Soja (LOX-1), Äpfeln, Baumwolle, Wassermelonen und Gurken (Tab. 3-3). Dagegen werden durch Tomaten, Kartoffeln und Mais vor allem 9-Hydroperoxide generiert.

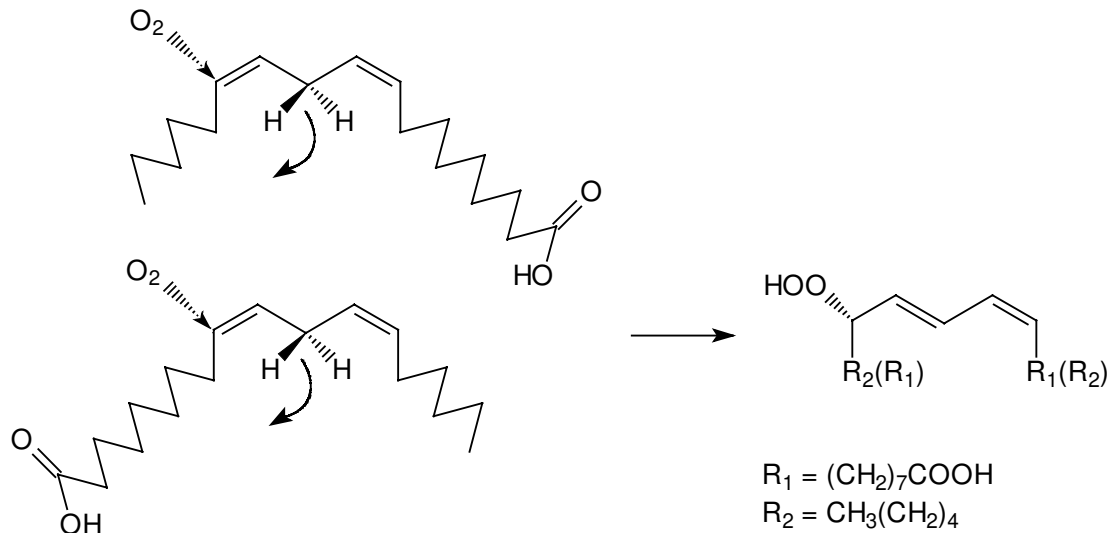


Abb. 3-1: Bildung der 9(S)- und 13(S)-Hydroperoxide aus Linolsäure durch Lipoxygenasen (modifiziert nach [1]).

Tab. 3-3: Regiospezifität und pH-Optima der Lipoxygenasen in unterschiedlichen Pflanzenarten.

Pflanze	pH-Optimum	Regiospezifität (%)		Literatur
		9	13	
Apfel	6,0	13-Isomer		[69]
Baumwolle	6,0-6,5	6	94	[37]
Birne	6,0	30	70	[70]
Gerste	LOX-1	6,3	80 : 20	[64]
	LOX-2	6,0 + 8,0	37 : 63 (C18:3) 47 : 53 (C18:2)	[64]
Gerste	k. A.	98	2	[71]
Gurke (Keimling)	5,5-6,0	15	85	[72]
Gurke (Frucht)	5,5	k. A.		[73]
Flachs	6,2	13-Isomer		[74]
Kartoffel (Knolle)	5,5-6,0	95	5	[75]
	6,8	91	9	[76]
Kidneybohne	k. A.	10	90	[77, 78]
Lupine	6,2	64	36	[79]
Luzerne	6,8	50	50	[72]
Mais	LOX-1	6,0-8,2	13-Isomer	[65]
	LOX-2	7-9	9-Isomer	[65]

Pflanze		pH-Optimum	Regiospezifität (%) 9 : 13	Literatur
Soja	LOX-1	9,0-9,5	5 : 95	[23]
		9,0	0 : 100	[20]
	LOX-2	6-7	50 : 50	[23]
	LOX-3	6-7	65 : 35	[23]
Tomate (Frucht)			95 : 5	[80]
		k. A.	9-Isomer	[81]
Wassermelone		4,5-5,5	0 : 100	[82]

k. A.: keine Angabe

Pflanzliche Lipoxygenasen unterscheiden sich sowohl in ihrer Regiospezifität als auch in ihrer Stereospezifität (Tab. 3-4). Es fällt auf, daß in vielen Fällen vor allem das dominierende Regioisomer eine hohe optische Reinheit aufweist. So liegen die Hauptprodukte der Lipoxygenasen aus Erbsen (LOX-2), Soja (LOX-1), Tomaten und Weizen über 97 % als (*S*)-Enantiomer vor. Im Gegensatz dazu vermindert sich die optische Reinheit bei den Neben-Regioisomeren und erreicht teilweise racemische Verhältnisse.

Tab. 3-4: Regio- und Stereospezifität ausgewählter Lipoxygenasen [10].

Pflanze		pH	Regiospezifität		Stereospezifität	
			9 : 13	13(<i>S</i>) : 13(<i>R</i>)	9(<i>S</i>) : 9(<i>R</i>)	
Erbse	LOX-1	6,8	61 : 39	59 : 41	52 : 48	
Erbse	LOX-2	6,8	11 : 89	98 : 2	54 : 46	
Mais		6,6	86 : 14	79 : 21	94 : 6	
		7,4	91 : 9	50 : 50	94 : 6	
Soja	LOX-1	9,0	2,5 : 97,5	97 : 3	61 : 39	
		6,6	23 : 77	94 : 6	92 : 8	
Soja	LOX-2	9,0	65 : 35	87 : 13	22 : 78	
		6,6	75 : 25	50 : 50	45 : 55	
Tomate		5,5	85 : 15	87 : 13	99 : 1	
Weizen		6,8	85 : 15	66 : 33	97,5 : 2,5	

Hydroperoxid-Lyase

Hydroperoxid-Lyasen sind Membranenzyme, die aus mehreren Untereinheiten (3 [27], 4 [30]) bestehen. Obwohl die von Hydroperoxid-Lyasen katalysierte Reaktion, die Spaltung von Hydroperoxy-Fettsäuren in einen Aldehyd und eine ω -oxo-Carbonsäure, seit über zwei Jahrzehnten bekannt ist [83], herrscht bislang Unklarheit über den genauen Mechanismus der Spaltung und die Struktur des Enzyms. Ein großer Fortschritt wurde mit der Entdeckung von Häm *b* als prosthetischer Gruppe im aktiven Zentrum [28] und der Aufklärung der Aminosäuresequenz der Lyase aus Paprika erzielt, woraufhin die Hydroperoxid-Lyase in die neue Cytochrom P450 Unterfamilie CYP74B eingruppiert wurde [84]. Im Gegensatz zu Cytochrom P450 Monooxygenasen benötigt die Hydroperoxid-Lyase weder molekularen Sauerstoff noch Reduktionsäquivalente, um ihre katalytische Aktivität auszuüben. Auch fehlt ihr die für Cytochrom P450 charakteristische Eigenschaft der Absorption des Fe(II)-CO Komplexes bei 450 nm [84].

Alle bislang untersuchten Hydroperoxid-Lyasen akzeptierten die jeweiligen (*S*)-Hydroperoxide als Substrate, wobei allerdings anzumerken ist, daß nur in einem Fall die Substratspezifität mit racemischen Hydroperoxiden untersucht wurde [85]. Hier wurden die (*R*)-Hydroperoxide jedoch nicht von der Lyase gespalten.

Aufgrund ihrer Substratspezifität können pflanzliche Hydroperoxid-Lyasen in zwei große Kategorien eingeteilt werden: die eine Gruppe der Lyasen spaltet ausschließlich 13-Hydroperoxide, während die andere Gruppe nur 9-Hydroperoxide als Substrate verwendet. In den meisten Pflanzen sind Hydroperoxid-Lyasen des ersten Typs vertreten (Tab. 3-5). Eine Ausnahme stellen Birnen dar, die eine nur für 9-Hydroperoxide spezifische Lyase besitzen [86]. In Gurken [87] und Blättern der Kidneybohne [77] werden dagegen beide Hydroperoxid-Isomere gespalten. MATSUI et al. konnte die Aktivität gegenüber beiden Isomeren in Gurkencotyledonen auf zwei Isoenzyme mit unterschiedlicher Substratspezifität zurückführen [88].

Tab. 3-5: Substratspezifität der Hydroperoxid-Lyase in unterschiedlichen Pflanzenarten.

Pflanze	Organ	13-Hydroperoxide	9-Hydroperoxide	Literatur
Apfel	Frucht	+	-	[89]
Birne	Frucht	-	+	[86]
Gurke	Frucht	+	+	[90, 87]
Gurke	Cotyledonen	+	+	[88]
Kidneybohne	Blätter	+	+	[77]
Luzerne	etiolierte Keimlinge	+	-	[72]
Paprika, grün	Frucht	+	-	[27]
Soja	Keimlinge	+	-	[30, 85]
Soja	Samen	+	+ (nur 9-HPOD)	[85]
Soja	Chloroplasten	+	-	[85]
Sonnenblume	Keimlinge	+	-	[91]
Tee	Blätter	+	-	[67, 92]
Tomate	Frucht	+	-	[89, 93]
Wassermelone	Keimlinge	+	n. b.	[82]

n. b.: nicht bestimmt

3.2. Verwendung einer Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnenkeimlingen zur Bildung von 2E-Hexenal

Im Gegensatz zu bisherigen biotechnologischen Verfahren zur Gewinnung natürlicher Grünnoten, die als Enzymquellen verschiedene Gemüsesorten [13, 94], agronomische Abfallprodukte [17, 18, 19, 20], Pflanzenzellkulturen [95, 96, 97] oder Früchte [13, 98] verwendeten, wurden in dieser Arbeit Mungbohnenkeimlinge ausgewählt. Im Hinblick auf maximalen Umsatz des Substrates zu 2E-Hexenal wurden einige Reaktionsparameter der Hydroperoxidspaltung optimiert, wobei zunächst der Verlauf der Hydroperoxid-Lyase-Aktivität während der Entwicklung von Mungbohnenkeimlingen im Vordergrund stand. Dies sollte die Selektion eines enzymatisch besonders aktiven Pflanzenmaterials ermöglichen.

3.2.1. Alter der Keimlinge

Die Hydroperoxid-Lyase-Aktivität wurde anhand der 2*E*-Hexenal-Bildung nach Zusatz von 13-HPOT verfolgt (vgl. 2.4.1.). Mungbohnenkeimlinge zeigten in den ersten 8 Tagen der Keimung einen sehr starken Anstieg der Hydroperoxid-Lyase-Aktivität, wobei das Maximum ca. am 12. Tag auftrat. Hier wurde mit 443 mg kg⁻¹ 2*E*-Hexenal und einer Umsatzrate von 49,1 % ein Ergebnis erzielt, das vielen früheren Arbeiten vor allem in bezug auf die Höhe des Umsatzes weit überlegen war (vgl. Tab. 3-6). In den darauf folgenden Tagen nahm die Aktivität jedoch leicht ab.

Dieser Verlauf entsprach weitgehend der Entwicklung der Lyase-Aktivität in Primärblättern der Kidneybohne [78]. Im Vergleich dazu wurde bei etiolierten Keimlingen aus Gurken [72], Wassermelonen [82] und Soja [30] das Aktivitätsmaximum mit Tag 6 [30, 82] bzw. 7 [72] früher erreicht und der Rückgang der Aktivität war wesentlich ausgeprägter. ZHUANG et al. stellten bei Blättern der Sojabohne, die nach der Blüte gepflückt wurden, eine mit zunehmendem Alter ansteigende Hydroperoxid-Lyase-Aktivität fest, während sich die Aktivität der Lipxygenase verminderte [99].

Zur Erklärung dieses Verlaufes muß das Vorkommen der Hydroperoxid-Lyasen in pflanzlichen Gewebearten und die subzelluläre Verteilung berücksichtigt werden. Hydroperoxid-Lyasen kommen membrangebunden in grünen und in nicht-grünen Gewebearten vor [2, 100]. Beispiele für ein Vorkommen in grünem Gewebe sind u. a. Lyasen aus Blättern der Kidneybohne [77, 78], Tee [92], Gurkenschalen [101], Gurkenfleisch ohne Schale [102] und grüne Paprika [27]. Nicht-grüne Gewebearten, die Hydroperoxid-Lyase-Aktivität aufweisen, umfassen z. B. Birnen [86], Tomaten [89, 93, 103], Äpfel [89] und etiolierte Keimlinge verschiedener Pflanzen wie Soja [30], Luzerne [72], Gurken [72] und Wassermelonen [82].

In grünem Gewebe sind Hydroperoxid-Lyasen vor allem in den Chloroplasten [104, 105] lokalisiert, in denen sie an Thylakoid- [92, 94] und Envelope-Membranen [106] gebunden sind. Außerdem wurden sie in Plasmamembranen und Membranen des Golgi-Apparates sowie des Endoplasmatischen Reticulums nachgewiesen [87, 101]. Bei nicht-grünem Gewebe entfällt das Vorkommen in den Chloroplasten.

Der während der Keimung von Mungbohnen beobachtete Verlauf der Hydroperoxid-Lyase-Aktivität stand in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten von Chloroplasten, was durch eine Grünfärbung (Chlorophyllbildung) des Keimlings optisch leicht erkannt werden konnte. Nachdem in den ersten 2-3 Tagen die Bildung von Wurzeln

eingesetzt hatte, wurden Chloroplasten erst ab dem 4. Tag wahrgenommen (einsetzende Grünfärbung der Cotyledonen). Bis zu diesem Zeitpunkt besaßen die Keimlinge eine verhältnismäßig geringe Hydroperoxid-Lyase-Aktivität, die sich mit dem Auftreten der Primärblätter am 5-6. Tag in etwa verdoppelte. Das Maximum der Enzymaktivität fiel mit einer starken Expansion der Primärblätter und vermehrter Bildung von Chloroplasten am 10-12. Tag, die mit einer Farbänderung der Blätter von hellgrün nach dunkelgrün einherging, zusammen. Die folgenden Tage zeichneten sich durch ein starkes Längenwachstum des Keimlings, allerdings bei verlangsamter Blattexpansion, aus.

Diese Beobachtungen befanden sich mit Untersuchungen von SEKIYA et al. im Einklang, die eine Korrelation zwischen dem Chlorophyllgehalt von Blättern und deren Hydroperoxid-Lyase-Aktivität feststellten. Blätter mit hoher Chlorophyllkonzentration wiesen gleichzeitig eine große Enzymaktivität auf [16]. Während der Reifung von Paprika, die eine Umwandlung der Chloroplasten in Chromoplasten beinhaltet, verringerte sich die Aktivität der Hydroperoxid-Lyase mit fortschreitender Farbänderung von grün nach rot auf 30 % der Anfangsaktivität [107]. Offensichtlich ist die an Chloroplasten gebundene Hydroperoxid-Lyase für die Gesamtaktivität einer Pflanze von herausragender Bedeutung, was den Anstieg der Hydroperoxid-Lyase-Aktivität im Verlauf der Keimung von Mungbohnen erklärt.

3.2.2. pH-Optimum

Für die Bildung von 2E-Hexenal aus 13-HPOT wurde ein pH-Optimum von pH 6,5 ermittelt (vgl. 2.4.1.). Es befand sich damit in dem weiten Bereich der pH-Optima anderer Hydroperoxid-Lyasen, der sich von pH 5 in *Marchantia polymorpha* [108] bis hin zu pH 8 in Cotyledonen von Gurkenkeimlingen erstreckte [88]. Weitere pH-Optima des Enzyms aus anderen Pflanzenarten wurden mit pH 5,5 in grünen Paprika [27], Tomaten (Frucht) [89], pH 6-6,5 in Wassermelonenkeimlingen [82], Gurkenkeimlingen [72] und Früchten [90], Birnen [86], pH 6-7 in Sojakeimlingen [30], pH 7 in Tomatenblättern [93], Kidneybohnenblättern [77] sowie pH 7,5 in Teeblättern [67] angegeben.

3.2.3. Inkubationszeit

Bei der Wahl des Zeitraumes, in dem die Inkubation des Homogenates mit dem Substrat 13-HPOT stattfinden sollte, waren zwei Faktoren zu beachten. Zum einen mußte gewährleistet sein, daß dem Enzym eine ausreichende Reaktionszeit eingeräumt wurde, damit das Substrat nach Möglichkeit vollständig umgesetzt wurde. Andererseits mußte vermieden werden, daß sich die Konzentration des gebildeten Produktes in enzymatischen oder chemischen Nebenreaktionen verringerte. Vorstellbar waren z. B. die Reduktion des 2*E*-Hexenals zu 2*E*-Hexenol durch Alkohol-Dehydrogenasen, Aldolkondensation oder die Reaktion des Aldehyds mit Proteinen zu Schiffsbasen.

Die Hydroperoxidspaltung verlief mit sehr hoher Geschwindigkeit und war nach 15 min abgeschlossen, da sich danach die Produktkonzentration nicht weiter erhöhte (vgl. 2.4.2.). Trotzdem wurde in den folgenden Experimenten die Inkubation 1 h durchgeführt, um auch bei höheren Substratkonzentrationen eine genügend lange Reaktionszeit sicherzustellen. Die schnelle Isomerisierung des primären Hydroperoxid-Lyase-Produktes 3*Z*-Hexenal zu 2*E*-Hexenal legte die Vermutung nahe, daß Mungbohnenkeimlinge eine sehr aktive 3*Z*,2*E*-Enal-Isomerase enthielten [8]. In einem Homogenat aus Apfelschalen wurde eine ähnliche Kinetik für 3*Z*-Hexenal beobachtet [18].

Nebenreaktionen des Produktes schienen nicht einzutreten, da sich innerhalb des untersuchten Zeitraumes bis 90 min die Konzentration von 2*E*-Hexenal nicht verringerte. Eine über die im Blindwert hinausgehende Menge an 2*E*-Hexenol wurde nicht beobachtet, was möglicherweise auf einen Mangel des für die Alkohol-Dehydrogenase wichtigen Cosubstrates (NADH) oder auf seine nicht ausreichende Regenerierung ($\text{NAD} \rightleftharpoons \text{NADH}$) hindeutete.

Trotz Variation der Inkubationszeit wurde das Substrat nur unvollständig umgesetzt (48,9 %). Zwar wurden Nebenreaktionen von 2*E*-Hexenal ausgeschlossen, aber es bestand ferner die Möglichkeit, daß die Hydroperoxid-Lyase entweder durch die beiden Spaltprodukte oder das Substrat inhibiert wurde. Als weitere Erklärung mußte zudem der Metabolismus von 13-HPOT durch andere Enzyme oder dessen Reaktion mit anderen Inhaltsstoffen im Reaktionsansatz in Betracht gezogen werden. Hierauf wird an späterer Stelle detaillierter eingegangen (vgl. 3.4.2.).

3.2.4. Substratkonzentration

Die Bildung von 2*E*-Hexenal ließ sich durch eine Erhöhung der Substratkonzentration beachtlich steigern (vgl. 2.4.4.). Als maximale Konzentration wurden nach Zusatz von 32,6 mmol kg⁻¹ 13-HPOT **1.064 mg kg⁻¹** 2*E*-Hexenal erhalten, was in einem weiteren Experiment unter fast identischen Bedingungen mit **1.070 mg kg⁻¹** 2*E*-Hexenal reproduziert werden konnte (vgl. 2.4.5.). In Verbindung mit den hohen Umsatzraten, die in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration zwischen 18,6-46,0 % lagen (vgl. 2.4.4.), bestätigten diese hohen Konzentrationen die Eignung der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen zur Gewinnung von 2*E*-Hexenal. Zum Teil wurden die in anderen biotechnologischen Verfahren maximal erreichten Konzentrationen für 2*E*-Hexenal und Umsatzraten deutlich übertroffen (Tab. 3-6).

In einem von MULLER et al. durchgeführten Screening verschiedener Obst- und Gemüsesorten wurden mit 13-HPOT als Substrat Konzentrationen für 3*Z*- und 2*E*-Hexenal (Summe) in einem Bereich von 100-370 mg kg⁻¹ erhalten [13]. In einem Produktionsmaßstab lag der maximale Gehalt bei 1.800 mg kg⁻¹ 2*E*-Hexenal, wobei die Umsatzrate 23,8 % betrug. Das verwendete Pflanzenmaterial wurde in dem Artikel nicht näher spezifiziert, so daß eine Nachprüfung nicht möglich war [13].

Tab. 3-6: In biotechnologischen Verfahren maximal erzielte Gehalte für 2*E*-Hexenal.

Pflanze	Substrat	2 <i>E</i> -Hexenal (mg kg ⁻¹)	Umsatz (%)	Literatur
Guave	13-HPOT	1.500 ^a	20	[98]
Mungbohnen	13-HPOT	1.070	33	diese Arbeit
Melonenblätter	C18:3	400-1.100 ^b	k. A.	[20]
Apfelschalen	C18:3	583	16,5	[18]
Ackerquecke	C18:3	210	5,9	[17]
Luzerne (Zellkulturen)	C18:3	80-180	k. A.	[96]
Apfel (Zellkulturen)	C18:3	9,4	0,3	[95]

^a: mg kg⁻¹ Reaktionsansatz

^b: Summe aller C₆-Verbindungen

k. A.: keine Angabe

Es fällt auf, daß die Umsatzraten vor allem dann niedrig waren, wenn Linolensäure (C18:3) als Substrat eingesetzt wurde (Tab. 3-6). Weil unter diesen Bedingungen die Bildung von 2*E*-Hexenal sowohl von der Lipoxygenase als auch von der Hydroperoxid-Lyase abhängt, verläuft die Reaktion insgesamt nur suboptimal, wenn sich auch nur

ein einziger Parameter wie z. B. der pH-Wert außerhalb des optimalen Bereiches eines der beiden Enzyme befindet. Außerdem kann die Bildung von 13-HPOT aus Linolensäure durch endogen in der Pflanze vorkommende Lipoxygenase zum Nadelöhr der Gesamtreaktion werden, da eine Inhibierung der Lipoxygenase durch ihr Produkt eintreten kann [109, 110]. In den eigenen Versuchen wurden durch die getrennte Durchführung beider Reaktionen und eine ausreichend hohe Lipoxygenase-Konzentration diese Probleme umgangen, was offensichtlich den Schlüssel zu hohen Umsatzraten darstellte.

Ursachen für die mit zunehmender Substratkonzentration beobachtete Verringerung der Umsatzrate von 46,0 % auf 18,6 % ließen sich ohne gleichzeitige Analytik des Substrates oder eventueller nichtflüchtiger Nebenprodukte, die mit der bisherigen Analytik (vgl. 4.2.2., GC-System: 1, 2) nicht erfaßt werden konnten, aus diesem Experiment nur schwer ableiten. Rein rechnerisch betrachtet, erschien es unwahrscheinlich, daß die Inkubationsdauer nicht ausreichend war. In 2.4.2. wurde nach 15 min bei einer Konzentration von $7,74 \text{ mmol kg}^{-1}$ 13-HPOT keine weitere Produktbildung festgestellt. Im Vergleich dazu war in 2.4.4. zwar die Substratkonzentration bei dem 2*E*-Hexenal-Maximum ungefähr um den Faktor 4 höher, aber es stand dem Enzym mit 60 min auch die vierfache Zeit zur Verfügung. Diese Annahme traf jedoch nur unter der Voraussetzung zu, daß keine Inhibierung der Hydroperoxid-Lyase erfolgte, die nicht auszuschließen war (vgl. 3.3.3.1.).

3.2.5. Einsatz von Rohextrakten zur Gewinnung von 2*E*-Hexenal

In den Versuchen 2.1.-2.4. wurden Homogenate aus Mungbohnenkeimlingen als Enzymquelle der Hydroperoxid-Lyase zur Gewinnung von 2*E*-Hexenal eingesetzt. Die Verwendung eines partikelfreien, enzymatisch aktiven Rohextraktes in einem biotechnologischen Verfahren anstelle eines Homogenates erschien aufgrund der besseren Handhabung vorteilhafter. Im Gegensatz zu Algen, die eine lösliche Hydroperoxid-Lyase, allerdings mit abweichendem Produktspektrum (C_5 -, C_{13} -Fragmente), besitzen [111, 112], kommt die Hydroperoxid-Lyase in höheren Pflanzen membrangebunden vor [27, 67, 93]. Daher ist zur Herstellung eines enzymatisch aktiven Rohextraktes die Solubilisierung mit einem Detergenz erforderlich. Während der Solubilisierung werden die geordneten Membranstrukturen zerstört und Membranlipide und Membranproteine in Detergenzmizellen eingebettet, die die native Membran simulieren. Ziel ist es, hy-

drophobe Membranproteine durch das Detergenz in Lösung zu halten und eine Aggregation zu verhindern (vgl. auch 3.3.1.).

Zur Solubilisierung wurde das nichtionische Detergenz Triton X-100 verwendet. Es zeigte sich, daß das konventionelle Homogenat (kein Triton) durch einen mit 0,1 % Triton X-100 hergestellten Rohextrakt, der eine Konzentration von 543 mg kg^{-1} 2*E*-Hexenal und eine Umsatzrate von 46,2 % ergab, leicht übertroffen wurde, was den Erfolg der Solubilisierung dokumentierte (vgl. 2.5.1.). Auch in dem Rohextrakt ohne Detergenz konnte anhand der Produktbildung Hydroperoxid-Lyase-Aktivität nachgewiesen werden, die aber wesentlich geringer ausfiel als in dem mit Detergenz hergestellten Rohextrakt. Die Vermutung, daß das Enzym zumindest teilweise in gelöster Form in den Keimlingen vorlag, war jedoch nicht zutreffend. Wie sich später im Rahmen der Enzymbereinigung herausstellte, enthielt der nach Zentrifugation bei 6.400 *g* erhaltene Rohextrakt noch kleinere Zellfragmente, die erst bei einer höheren *g*-Zahl sedimentierten und offensichtlich zur Bildung von 2*E*-Hexenal beitrugen.

Ein maßgeblicher Einfluß der Solubilisierungszeit, die im Bereich von 0 bis 90 min variiert wurde, auf die Bildung von 2*E*-Hexenal in den Rohextrakten war nicht zu beobachten (vgl. 2.5.2.). Überraschenderweise wurde in dem Rohextrakt, der direkt nach dem Homogenisieren durch Zentrifugation in Rohextrakt und Sediment getrennt wurde (Solubilisierungszeit: 0 min), in etwa genauso viel 2*E*-Hexenal (543 mg kg^{-1}) gebildet, wie in den anderen Proben ($547\text{-}557 \text{ mg kg}^{-1}$). Dieses Ergebnis wurde darauf zurückgeführt, daß während der Homogenisierung und der 20 min andauernden Zentrifugation offensichtlich ausreichend Enzym solubilisiert wurde. Daher wurde in weiteren Experimenten mit Rohextrakten auf eine zusätzliche Solubilisierungsphase verzichtet. Auch aus diesem Versuch ließ sich keine Ursache für den unvollständigen Substratumsatz ableiten, was wiederum die Notwendigkeit einer begleitenden Substrat- und Nebenprodukt-Analytik verdeutlichte (vgl. 3.4.).

Die Untersuchung zur Abhängigkeit der Bildung von 2*E*-Hexenal von der Detergenzkonzentration ergab, daß die Hydroperoxid-Lyase-Aktivität in Rohextrakten zwischen 0,1-0,5 % Triton X-100 am größten war, während sie sich bei höherer Detergenzkonzentration verringerte (vgl. 2.5.3.). Dies deutete darauf hin, daß das Enzym durch Triton X-100 teilweise inhibiert wurde. Eine Enzyminhibierung wurde nicht nur mit Triton X-100, sondern auch mit anderen nichtionischen Detergenzien wie Tween 20, Octyl- β -D-glucopyranose und CHAPS beobachtet [30]. Im Hinblick auf das Verhältnis von Solubilisierung zu Denaturierung war bei Sojakeimlingen eine Konzentration von

0,2 % Triton X-100 am günstigsten [30]. Als optimaler Kompromiß zwischen effektiver Solubilisierung und Enzyminhibierung erwies sich bei der Isolierung der Hydroperoxid-Lyase aus Tomatenblättern dagegen eine Konzentration von 0,5 % Triton X-100 [93]. In den eigenen Experimenten wurde der Rohextrakt unter Standardbedingungen mit 0,1 % Triton X-100 hergestellt, da bei der Flüssig/Flüssig-Extraktion der Produkte so die Phasentrennung schneller erfolgte.

Die Versuche zeigten, daß mit Triton X-100 eine effektive Solubilisierung der Hydroperoxid-Lyase möglich war. Die auf diese Weise erhaltenen Rohextrakte stellten einen gleichwertigen Ersatz für die bislang verwendeten Homogenate dar, denen sie in bezug auf die Höhe der Produktkonzentration und Umsatzrate nichts nachstanden. Auch hinsichtlich anderer Eigenschaften wie z. B. pH-Optimum und Kinetik der *2E*-Hexenal Bildung waren sie den Homogenaten vergleichbar (vgl. 2.5.4.).

3.2.6. Bildung von *2E*-Hexenal und Hexenal aus Leinöl

Der Einsatz von reiner Linolensäure als Rohstoff in einem industriellen Prozeß zur Produktion von *2E*-Hexenal ist wegen des hohen Preises unwirtschaftlich. Eine preisgünstigere Alternative stellt Leinöl dar, da es sich durch einen hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren auszeichnet, wobei der größte Anteil auf Linolensäure entfällt (vgl. 2.7.1.). So beträgt der Preis für 5 mL Linolensäure (99 %, Fluka) 520 DM, während 250 mL Leinöl aus einem Naturkostladen für ca. 7 DM bezogen werden können.

Eine direkte Peroxidierung des Leinöls erschien nicht ratsam. Zwar vermag die Lipxygenase-1 aus Soja auch veresterte Fettsäuren (Phospholipide, Mono-, Di-, Triacylglyceride) umzusetzen [113, 114, 115], aber hierbei müssen im Vergleich zu freien Fettsäuren drastisch verschlechterte Umsatzraten in Kauf genommen werden. So wurden unter optimierten Bedingungen nur 15 % der in Trilinolein verfügbaren Linolsäure peroxidiert [113]. Da außerdem unbekannt war, ob die Hydroperoxid-Lyase dazu in der Lage war, ein komplexes und heterogenes Triacylglycerid, das peroxidierte Linol- und Linolensäure enthielt, zu spalten, wurde diese Vorgehensweise verworfen.

Um Leinöl dem enzymatischen Verfahren zugänglich zu machen, war eine vorherige Hydrolyse erforderlich. Eine alkalische Hydrolyse des Öls schied aufgrund der geltenden Rechtslage aus, da aus diesem Hydrolysat gebildetes *2E*-Hexenal und Hexenal nicht der Definition eines „natürlichen“ Aromastoffs gemäß der Aromenverordnung [15]

entsprechen würden (vgl. 1.1.). Großtechnisch werden Fette unter hohem Druck (30-50 atm) und hohen Temperaturen (ca. 250 °C) unter Zufuhr von Wasserdampf thermisch hydrolysiert [116]. Die hieraus resultierenden Produkte sind extrem dunkel gefärbte Fettsäuren und eine verdünnte, ebenfalls farbige Glycerol-Lösung (ca. 10-12 %) [116, 117]. Zur Abtrennung von den gefärbten Verbindungen und anderen Nebenprodukten ist eine Redestillation der Fettsäuren notwendig. Nachteile dieses Verfahrens sind ein hoher Energieverbrauch und Polymerisationsprodukte ungesättigter Fettsäuren, die im Zuge der Autoxidation entstehen.

Weitaus schonender ist die enzymatische Hydrolyse von Triacylglyceriden. Daher wurde Leinöl mit einer Lipase aus *Candida rugosa* (früher: *Candida cylindracea*) hydrolysiert, die alle drei Acylreste aus dem Öl abspaltet, was einen möglichst hohen Umsatz erwarten ließ [116, 117, 118]. Obwohl die Lipase aus *Candida rugosa* ein Temperaturoptimum von 37 °C aufweist, wurde die Hydrolyse des Leinöls bei nur 25 °C durchgeführt, um die Autoxidation der ungesättigten Fettsäuren möglichst gering zu halten [118]. Einer Verlangsamung der Reaktion wurde durch Verwendung einer verhältnismäßig hohen Enzymkonzentration entgegengewirkt. Auf diese Weise wurde eine Hydrolyserate des Leinöls von $\geq 90\%$ nach 1,5 h erhalten (vgl. 2.7.2.).

Auch die Peroxidierung des hydrolysierten Leinöls erfolgte mit einer Ausbeute von $\geq 95\%$ nach 20 min nahezu quantitativ und war damit genau so hoch wie mit reiner Linol- bzw. Linolensäure als Substrat. Vor allem die Sättigung der Lösung mit Sauerstoff, dem Cosubstrat der Lipoxygenase, war ein entscheidender Parameter zur Erzielung hoher Umsatzraten. Sobald der Reaktionsansatz an Sauerstoff verarmt, können zahlreiche Nebenprodukte auftreten (Abb. 3-2).

Zu Beginn des Lipoxygenase-Zyklus liegt das Eisen im aktiven Zentrum des nativen Enzyms vornehmlich als katalytisch inaktives Fe^{2+} und nur zu ca. 1 % als Fe^{3+} vor, was als Ursache für die anfängliche Lag-Phase der Lipoxygenase-Reaktion angesehen wird [5, 119]. Im Verlauf der Katalyse gebildete Hydroperoxidmoleküle oxidieren das Eisen zu Fe^{3+} und sorgen so für eine Beschleunigung der Reaktion. Die nun in aktiver Form vorliegende Lipoxygenase LOX-Fe^{3+} abstrahiert stereospezifisch das pro(S)-Proton vom C_{11} des Fettsäuremoleküls, wobei ein Pentadienylradikal-System entsteht und das Enzym zu LOX-Fe^{2+} reduziert wird. Anschließend erfolgt die Insertion von molekularem Sauerstoff in das Fettsäure-Pentadienylradikal unter Bildung eines Peroxyradikals, das nach Aufnahme eines Elektrons von LOX-Fe^{2+} und eines Protons von dem Enzym-

Komplex dissoziiert. Das als LOX-Fe^{3+} zurückbleibende aktive Enzym setzt nun erneut den katalytischen Zyklus fort.

Unter (partiell) anaeroben Bedingungen wird hingegen das Fettsäure-Pentadienylradikal freigesetzt und polymerisiert, da die nachfolgende Insertion von Sauerstoff nicht stattfinden kann. Die Reaktion von LOX-Fe^{2+} mit bereits vorhandenen Hydroperoxidmolekülen führt zu einer Oxidation des Enzyms (LOX-Fe^{3+}) und zur Bildung von Alkoxyradikalen, die ihrerseits Sekundärreaktionen eingehen können.

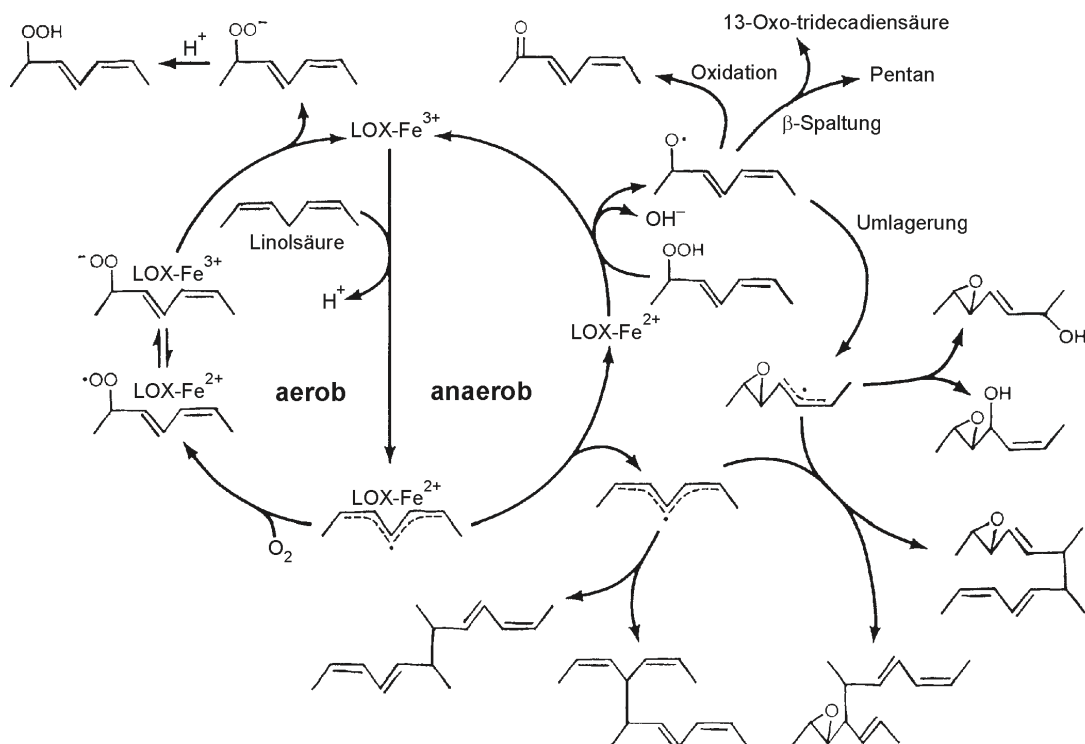


Abb. 3-2: Katalytischer Zyklus der Lipoxygenase am Beispiel von Linolsäure [1].

Bei einer Überprüfung der Reinheit des aus reiner Linolensäure gebildeten 13-HPOT mittels UV-Spektroskopie und HPLC (UV 235 nm) wurden jedoch keine Nebenprodukte festgestellt, was zeigte, daß die Sättigung des Reaktionsansatzes mit Sauerstoff offensichtlich ausreichend war (vgl. 2.6.). Auch bei der HPLC-Analytik des Hydroperoxids mit dem ELSD, der die Detektion von Nebenprodukten unabhängig von chromophoren Gruppen ermöglichte, wurden keine zusätzlichen Peaks detektiert, die unter Umständen mit dem anderen HPLC-System hätten übersehen werden können (vgl. 2.11.). Da bei der Reaktion der Lipoxygenase mit hydrolysiertem Leinöl identische Reaktionsbedingungen eingehalten wurden, waren auch hier keine Nebenprodukte zu erwarten.

Die Spaltung von 13-HPOT und 13-HPOD, die beide aus dem enzymatisch gewonnenen Leinöl-Hydrolysat hervorgingen, durch die Hydroperoxid-Lyase erwies sich wiederum als der kritischste Schritt des gesamten Enzymprozesses. So betrug die Umsatzrate bei der maximalen Konzentration von 2*E*-Hexenal (797 mg kg^{-1}) nur 20 %, nahm allerdings mit abnehmender Substratkonzentration auf 39 % zu (vgl. 2.7.3.). Obwohl die Produktkonzentration mit Leinöl als Ausgangsmaterial geringer war als mit reiner Linolensäure, lag sie dennoch z. T. deutlich über denen, die in anderen biotechnologischen Verfahren erhalten wurden (vgl. 3.2.4.).

Es kann zusammenfassend festgehalten werden, daß sich das entwickelte Verfahren zur Gewinnung von 2*E*-Hexenal durchaus eignet. Es ermöglicht die Konversion von Leinöl, einem billigen nachwachsenden Rohstoff, in den höherwertigen natürlichen Aromastoff 2*E*-Hexenal und kann somit zur Deckung des wachsenden Bedarfs an Grünnoten beitragen. Da Leinöl, Sojabohnen und Mungbohnen, die Quellen für die Lipoxygenase bzw. Hydroperoxid-Lyase, sowohl preisgünstig als auch in nahezu unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen, erscheint der unvollständige Umsatz aus ökonomischer Sicht von untergeordneter Bedeutung.

3.3. Partielle Enzymaufreinigung und Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen

Der Ersatz von Homogenaten aus Mungbohnenkeimlingen durch partikelfreie Rohextrakte, die die Hydroperoxid-Lyase in solubilisierter Form enthielten, stellte im Hinblick auf eine industrielle Nutzung des Verfahrens eine wesentliche Verbesserung dar, da sich diese besser handhaben ließen. Allerdings war es noch vorteilhafter, das Enzym auf einem festen Träger in immobilisierter Form einzusetzen, was eine wiederholte Nutzung des Biokatalysators ermöglichte und gleichzeitig dazu beitrug, die bei jeder Aufarbeitung anfallenden pflanzlichen und chemischen Abfälle zu vermindern. Mehr noch, dehnte man die Immobilisierung auch auf die beiden ersten an der Biogenese von 2*E*-Hexenal beteiligten Enzyme (vgl. Abb. 1-1) aus, so eröffnete sich eine völlig neuartige Strategie zur Gewinnung von natürlichem 2*E*-Hexenal mittels immobilisierter Enzyme.

Immobilisierte Lipasen werden seit langer Zeit bei der Modifikation von Fetten und Ölen genutzt [120] und viele Lipasen sind bereits in immobilisierter Form kommerziell erhältlich. Sie werden nicht nur in klassischen Hydrolyse-Reaktionen eingesetzt [116, 118],

sondern finden auch breite Anwendung in nicht-konventionellen organischen Reaktionssystemen [121, 122] u. a. bei der Synthese von aromaaktiven Estern [123, 124], Thioestern [125], Mono- und Diacylglyceriden [126] und bei Umesterungen [127].

Im Gegensatz dazu werden von den Lipoxygenasen nur einige Isoenzyme aus Soja kommerziell angeboten, von denen LOX-1 die regio- und stereospezifische Bildung von 13(S)-Hydroperoxiden katalysiert. Allerdings muß die Immobilisierung der Lipoxygenase, ebenso wie deren Isolierung aus anderen Quellen, von dem jeweiligen Anwender selbst durchgeführt werden. Seit der ersten kovalenten Immobilisierung der Soja-Lipoxygenase im Jahr 1982 durch LAAKSO [128] wurde der Nutzen des katalytischen Potentials dieses Enzyms für biotechnologische Prozesse erst Anfang der 90er Jahre wiederentdeckt. Es folgten die Immobilisierung mit unterschiedlichen Techniken (kovalent, adsorptiv, Gel-Einschluß) nicht nur der Lipoxygenase aus Soja [129, 130, 131, 132, 133, 134], sondern auch aus Kartoffeln [135, 136, 137], Erbsen [137, 138] und Lupinen [137].

Hydroperoxid-Lyasen stellen von den an der Biogenese des 2E-Hexenals beteiligten Enzymen das kritischste dar, da sie nicht käuflich zu erwerben sind und wenig über ihre Struktur und den Mechanismus der Hydroperoxidspaltung bekannt ist. Aus höheren Pflanzen wurde bislang keine einzige Hydroperoxid-Lyase immobilisiert, wohl aber aus einzelligen Algen (*Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella fusca*) [139, 140]. Diese unterscheiden sich von den membrangebundenen Lyasen höherer Pflanzen in ihrer Löslichkeit und Produktspezifität (Spaltung der Hydroperoxide in C₅- und C₁₃-Fragmente) [111, 112]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Schwerpunkt nicht auf die Immobilisierung der Lipase oder Lipoxygenase gelegt, sondern auf die der anspruchsvolleren Hydroperoxid-Lyase.

3.3.1. Partielle Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase

Da in Pflanzen zahlreiche auf den Metabolismus von Hydroperoxiden spezialisierte Enzyme existieren (vgl. 3.4.), wurde vor der Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase eine Aufreinigung angestrebt, um diese um das Substrat konkurrierenden Enzyme abzutrennen und damit eine potentielle Verminderung der Ausbeute an 2E-Hexenal zu verhindern (vgl. 2.8.).

In der Regel ist die Aufreinigung von Hydroperoxid-Lyasen mit Schwierigkeiten verbunden, die zum einen darauf zurückgeführt werden können, daß das Enzym in Pflanzen nur in sehr geringer Menge vorkommt und die zum anderen in der Natur des Enzyms selbst begründet sind. Tatsächlich wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt erst drei Hydroperoxid-Lyasen aus Tee [67], grünen Paprika [27] und Tomatenblättern [93] bis zu scheinbarer Homogenität isoliert.

Auch aus Mungbohnenkeimlingen war die Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase problematisch. Die Beobachtung, daß die Solubilisierung des Enzyms aus Membranfragmenten ein Detergenz erforderte, wurde als Hinweis darauf angesehen, daß es sich bei der Lyase um ein integrales (intrinsisches) Membranprotein handelte. Im Vergleich zu integralen Membranproteinen, die in die Membranen eingebettet sind, können periphere (extrinsische) Membranproteine, die über elektrostatische oder unpolare Wechselwirkungen an der Oberfläche der Membran assoziiert sind, durch Veränderungen der Puffer-Ionenstärke, chaotrope Reagenzien oder verdünnte Säuren bzw. Laugen abgelöst werden [29, 141].

In den ersten Vorversuchen zur Solubilisierung wurde zunächst das nichtionische Detergenz Triton X-100 ausgewählt, das mit einem HLB-Wert (Hydrophilic-Lipophilic Balance) von 13,5 innerhalb des Bereiches (12-14,5) lag, der üblicherweise zur Extraktion integraler Proteine angewendet wird [142], aber später durch die reduzierte Form Triton X-100R ersetzt. Durch die Hydrierung des Phenolringes wird die UV-Absorption des Detergenz bei der zur Detektion von Proteinen verwendeten Wellenlänge (280 nm) verringert, aber nicht seine solubilisierenden Eigenschaften beeinträchtigt [143].

Die Ausbeute an enzymatisch aktiver Hydroperoxid-Lyase bei der Solubilisierung der Membranfraktion war mit ca. 35-40 % im Vergleich zum Rohextrakt verhältnismäßig niedrig (vgl. 2.8.). Da in dem Überstand der Zentrifugation nur noch 7,2 % Enzymaktivität nachgewiesen wurden, lag die Ursache offensichtlich nicht in einer unvollständigen Sedimentation der Membranfragmente, sondern war vielmehr in der Solubilisierung selbst zu suchen.

Dieser Verlust an Enzymaktivität wird verständlich, wenn man sich den Vorgang der Solubilisierung detaillierter vor Augen führt. Oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration (Critical Micellar Concentration, CMC) liegen Detergenzien nicht mehr als Monomere in der Lösung vor, sondern lagern sich zu Mizellen zusammen, die thermodynamisch begünstigt sind und im Gleichgewicht mit den Monomeren stehen. Diese Mizel-

len dringen in die Lipid-Doppelschicht von Membranen ein, bis ab einer gewissen Konzentration die geordnete Struktur der Membran soweit gestört ist, daß ein Zerfall in ihre einzelnen Komponenten eintritt. Während die freigesetzten Membranlipide gemischte Mizellen mit dem Detergenz bilden, werden die hydrophoben Bereiche integraler Membranproteine mit einer monomolekularen Schicht amphiphiler Detergenzmoleküle umgeben und auf diese Weise von dem umgebenen Wasser abgeschirmt [29].

Der Erfolg der Extraktion eines integralen Membranproteins wird nun dadurch bestimmt, wie gut das Detergenz die ursprüngliche Umgebung des Enzyms in der Membran simulieren und somit die native Konformation des Enzyms erhalten kann. Dies beinhaltet auch, daß eine Dissoziation von aus mehreren Untereinheiten bestehenden Enzymen, wie es bei der Hydroperoxid-Lyase der Fall ist [27, 30, 67, 93], verhindert werden muß. Vermutlich gelang dies nicht bei allen Enzymmolekülen in gleichem Ausmaß, so daß teilweise eine Änderung der Konformation (= Denaturierung) eintrat, die in Abhängigkeit davon, wie gravierend sie ausfiel, entweder zum völligen Verlust oder zu einer partiellen Verringerung der Aktivität eines Enzymmoleküls führte. Bemühungen, die Aktivität in dem Solubilisat durch Variation der Detergenzkonzentration oder der Solubilisierungsdauer zu erhöhen, waren erfolglos (vgl. 2.8.1.).

Auch in anderen Arbeiten wurde sowohl bei Triton X-100 [30] als auch bei reduziertem Triton X-100R [85] eine Inhibierung der Hydroperoxid-Lyase während der Solubilisierung festgestellt. Dennoch erschien ein Wechsel des Detergenz wenig vielversprechend, da beispielsweise bei Sojakeimlingen mit Triton X-100 das beste Resultat erzielt wurde, während mit anderen Detergenzien das Verhältnis von Solubilisierung zu Denaturierung in der Reihenfolge Triton X-100 (0,2 %, w/v) > Octyl- β -D-glucopyranose (0,8 %, w/v) > CHAPS (0,5 %, w/v) > Tween 20 (0,15 %, w/v) abnahm [30]. GARDNER et al. beobachteten mit Tween 20 eine um den Faktor 1,7 schlechtere Solubilisierung der Lyase aus Chloroplasten als mit Triton X-100R [85].

Eine weitere ernstzunehmende Möglichkeit des Verlustes an aktivem Enzym bestand in dessen Degradation durch Proteinasen [29, 141]. Allerdings wurde durch einen Zusatz von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zum Solubilisierungspuffer, die inhibierend auf Serin- bzw. Metall-Proteinase wirken, gegenüber einer Kontrolle keine höhere Aktivität in dem Solubilisat erhalten (vgl. 2.8.4.). Somit war ein proteolytischer Abbau während der Solubilisierung nicht für

die im Vergleich zum Rohextrakt niedrige Hydroperoxid-Lyase-Aktivität im Solubilisat verantwortlich.

Als hydrophobes Membranprotein neigte die Hydroperoxid-Lyase zur Aggregation und Adsorption an dem chromatographischen Phasenmaterial und Oberflächen, sofern keine geeigneten Vorkehrungen getroffen wurden. Bei allen Arbeitsschritten war deshalb die ständige Anwesenheit eines Detergenz oberhalb seiner kritischen Mizellenkonzentration ($CMC_{\text{Triton X-100}}$: 0,015 %, w/v [29]) erforderlich, was sich zwar nachteilig auf die Effizienz der chromatographischen Trennung auswirkte, aber einem Verlust des Enzyms vorbeugte. Dies wurde exemplarisch am Beispiel der Gelpermeationschromatographie (GPC) demonstriert (vgl. 2.8.2.1.). Wurde Triton X-100R (0,1 %, w/v) nicht dem Elutionspuffer zugesetzt, so wurde die Hydroperoxid-Lyase offensichtlich vollständig am Phasenmaterial adsorbiert, da in den aufgefangenen Fraktionen keine Aktivität mehr feststellbar war. Im Gegensatz dazu beobachteten VICK und ZIMMERMAN bei der Hydroperoxid-Lyase aus Spinatchloroplasten eine Aggregation des Enzyms zu hochmolekularen Komplexen, die bei der GPC im Ausschlußvolumen eluierten [104]. Ob eine Aggregation oder Adsorption eintritt, wird vermutlich von der Hydrophobizität des jeweiligen Enzyms und den Eigenschaften des Phasenmaterials maßgeblich beeinflusst. Die starke Adsorption von Proteinen an Sephadex- und Sepharose-Säulen in Abwesenheit eines Detergenz ist literaturbekannt und wird auf hydrophobe Wechselwirkungen des Proteins mit unpolaren Zonen der Gele zurückgeführt [104].

Die Aufreinigung der Hydroperoxid-Lyase mittels GPC, Ionenaustauschchromatographie (IEC) und Chromatographie an Hydroxylapatit (HAC) war gekennzeichnet von einem hohen Verlust an Enzymaktivität, der bei der GPC 55 % und bei der IEC 69 % betrug, woraus eine Gesamtausbeute von nur 5,4 % der Anfangsaktivität resultierte (vgl. 2.8.2.3.). Verluste bei der Proteinaufreinigung treten einerseits dadurch auf, daß in der Regel die Aufreinigung nur mit den enzymatisch aktivsten Fraktionen fortgesetzt wird, um möglichst viel Fremdprotein abzutrennen und auf diese Weise eine hohe Aufreinigung zu erzielen. Andererseits kann eine weitere Ursache in der Stabilität des Enzyms liegen.

Untersuchungen zur Stabilität der Hydroperoxid-Lyase während der Lagerung in verdünnter Lösung bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 7-9) und Temperaturen (+4 °C, -30 °C) ergaben, daß es sich bei der Hydroperoxid-Lyase um ein instabiles Enzym handelte (vgl. 2.8.4.). Innerhalb von nur einem Tag nahm die Aktivität bei pH 8 und einer Temperatur von +4 °C um 71 % und bei -30 °C um 34 % ab. Die Enzymaufreinigung, die sich insgesamt über zwei Tage erstreckte, wurde unter ähnlichen Bedingun-

gen (pH: 7,8, $T_{\text{Chromatographie}}$: RT, $T_{\text{Lagerung, Tag}}$: +4 °C, $T_{\text{Lagerung, über Nacht}}$: -30 °C) durchgeführt, so daß der beobachtete Aktivitätsverlust durchaus nachvollziehbar war.

Gerade in verdünnten Proteinlösungen, die während einer Proteinaufreinigung in den chromatographischen Fraktionen vorliegen, kann eine Adsorption des Proteins an Glas- oder Kunststoffoberflächen zu verheerenden Verlusten führen. Anhand der Experimente zur Stabilität der Hydroperoxid-Lyase während der Lagerung (vgl. 2.8.4.) wurde deutlich, daß die Verringerung der Enzymaktivität niedriger ausfiel, wenn das Solubilisat unverdünnt aufbewahrt wurde. So waren nach viertägiger Lagerung des Solubilisates bei pH 7,0 und -30 °C bei einer Proteinkonzentration von 0,46 mg mL⁻¹ nur noch 61 % der Anfangsaktivität vorhanden (vgl. Abb. 2-33), bei 2,4 mg mL⁻¹ dagegen 94 % (vgl. Abb. 2-34). Ob tatsächlich eine Adsorption für die Verminderung der Hydroperoxid-Lyase-Aktivität im Verlauf der Aufreinigung verantwortlich war, konnte letztendlich nicht geklärt werden. Da alle Arbeitsschritte in Gegenwart eines Detergenz durchgeführt wurden, sollte eine Oberflächenadsorption eigentlich unterbleiben [144].

Als weitere Ursachen für den Aktivitätsverlust müssen auch eine Dissoziation des Enzyms in seine Untereinheiten oder eine Modifikation des aktiven Zentrums in Betracht gezogen werden. Oligomere Proteine sind gegenüber einer Verdünnung [144] oder einer Veränderung der Ionenstärke [145] besonders denaturierungsanfällig. Die Lagerung des Solubilisates bei -30 °C in Gegenwart von 0,25 M NaCl führte nach vier Tagen zu einem völligen Verlust der Enzymaktivität (vgl. 2.8.4.). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Monomeren durch das NaCl soweit beeinträchtigt wurden, daß in Verbindung mit einer bei niedrigen Temperaturen auftretenden Abschwächung der hydrophoben Wechselwirkungen [141] die Hydroperoxid-Lyase dissoziiert.

Zum Schutz der Sulfhydrylgruppen, die im aktiven Zentrum von Hydroperoxid-Lyasen vermutet werden [27, 67], vor einer Oxidation wurde in Vorversuchen sowohl dem Solubilisierungspuffer als auch den Eluenten 1 mM Dithiothreitol (DTT) zugesetzt. Da jedoch dadurch dem Aktivitätsverlust bei der Aufreinigung nicht entgegengewirkt werden konnte und zudem noch eine starke Störung des Protein-Assays (Lowry) stattfand, wurde auf dieses Additiv verzichtet.

Eine Reduktion des Arbeitsprotokolls um den gelpermeationschromatographischen Trennschritt, der nur einen geringen Aufreinigungseffekt bewirkte, hatte neben einer Verkürzung der Zeitdauer auf einen Tag eine deutlich verbesserte Ausbeute an akti-

vem Enzym auf 21,9 % zur Folge (vgl. 2.8.3.). Allerdings lag wiederum die Proteinkonzentration in den IEC-Fractionen, auch nach Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration, unterhalb der Bestimmungsgrenze. Dies veranschaulichte, daß der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen, wie bereits bei anderen Pflanzen festgestellt wurde [27, 93], mengenmäßig nur eine untergeordnete Bedeutung zukommt.

3.3.2. Immobilisierung von Enzymen

Unter dem Begriff „Immobilisierung“ versteht man ein Zurückhalten eines Enzyms durch chemische und/oder physikalische Methoden in einem definierten Reaktionsraum, so daß eine mehrfache Verwendung des Biokatalysators ermöglicht wird [146]. Im Vergleich zu gelösten Enzymen, die sich als homogene Katalysatoren in dem Reaktionsansatz befinden, können immobilisierte Enzyme (heterogene Katalysatoren) zahlreiche Vorteile aufweisen wie zum Beispiel

- Abtrennbarkeit und damit Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators,
- größere Stabilität der Enzymaktivität,
- keine Verunreinigung des Produktes durch den (verbrauchten) Biokatalysator,
- kontinuierliche Prozeßführung und bessere Prozeßkontrolle,
- höhere Raum-Zeit-Ausbeuten (kleinere Reaktoren und erhöhte Prozeßgeschwindigkeit durch größere Katalysatorkonzentrationen),
- positive Änderungen weiterer Parameter (z. B. pH- und Temperaturoptimum).

Da diese positiven Eigenschaften jedoch nicht generell auftreten, sondern stark von der Art des Enzyms abhängen, muß in dem konkreten Anwendungsfall abgewägt werden, ob eine Immobilisierung aus ökonomischer Sicht lohnend erscheint. Dies ist insofern wichtig, da die Immobilisierung auch mit Nachteilen bzw. Problemen verbunden sein kann [146]:

- teilweise hohe Immobilisierungskosten,
- u. U. hohe Aktivitätsverluste beim Immobilisierungsprozeß,
- behinderter Stofftransport (Diffusionslimitierung),
- „Ausbluten“ (Leakage) von Biokatalysatoren und Matrixbestandteilen,
- Inaktivierung des Enzyms durch Kumulierung von Inhibitoren und Ablagerung von Fremdstoffen,
- Gefahr mikrobieller Kontamination im Dauerbetrieb.

3.3.2.1. Unterschiedliche Immobilisierungsverfahren

Eine Klassifizierung der zahlreichen Immobilisierungsmethoden [147] für Enzyme kann basierend auf ihrer Art der Rückhaltung des Biokatalysators im Reaktionssystem vorgenommen werden (Abb. 3-3). Hiernach werden Einschlußverfahren, die zu einem in gelöster Form vorliegenden Biokatalysator führen, von Methoden unterschieden, bei denen das Enzym durch Fixierung in eine unlösliche Form überführt wird [146, 148].

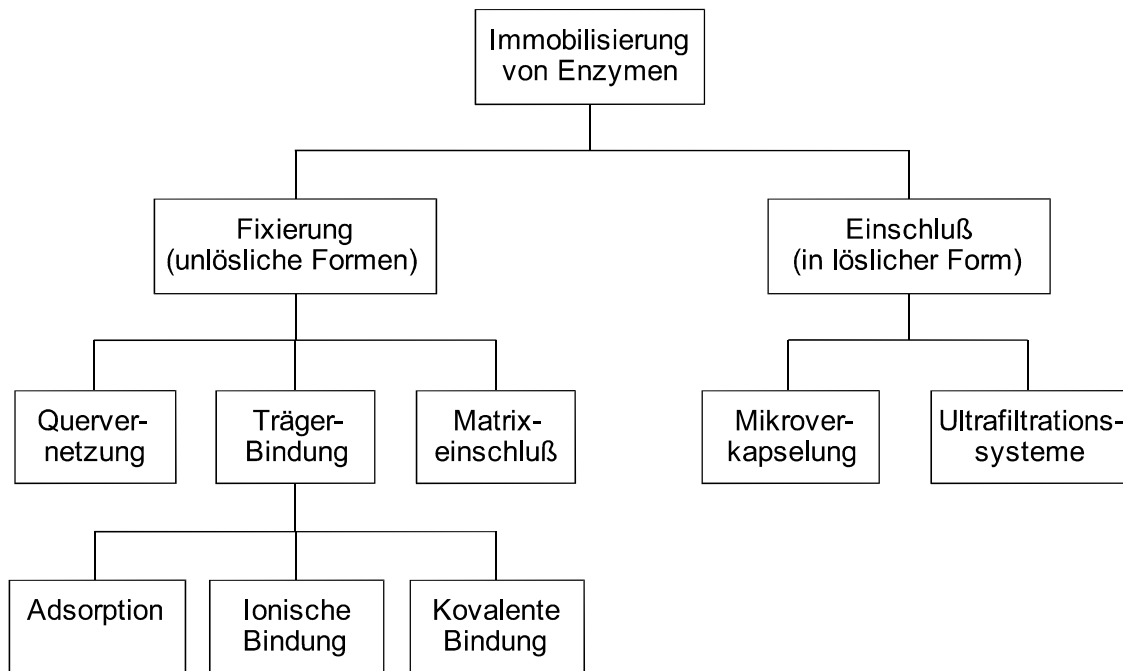


Abb. 3-3: Immobilisierungsverfahren.

Unter den *Einschlußverfahren* ist vor allem die Umhüllung des Enzyms mit einer semi-permeablen Membran zu nennen, wodurch das Enzym in unverändertem nativen Zustand durch die Membran in einem Reaktionsraum unterschiedlicher Größe oder Form eingeschlossen wird. Nach der Art dieses Reaktionsraumes werden *Mikrokapseln* (1-100 µm) von größeren *Ultrafiltrationssystemen* wie z. B. Membranreaktoren oder Hohlfasermodule abgegrenzt. Da bei diesen Verfahren kaum Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Immobilisierungsmaterial (Membran) auftreten, bleiben die katalytischen Eigenschaften weitgehend unverändert. Allerdings entfällt dafür die durch solche Wechselwirkungen bzw. Bindungen bewirkte, mitunter erhebliche Stabilisierung des Enzyms [146].

Eine *Fixierung* von Enzymen kann auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden. Bei der *Quervernetzung* werden die Enzyme entweder allein oder unter Zusatz von katalytisch inaktivem Material (z. B. Proteine, Polyamine, Polyhydroxyverbindungen)

durch bifunktionelle Reagenzien intermolekular zu einem dreidimensionalen hochmolekularen Netzwerk verbunden. Glutardialdehyd wird unter den Vernetzern, die in der Regel Aldehyd-, Isocyanat-, Diazo- oder Oxirangruppen enthalten, am häufigsten verwendet. Dem Vorteil der leichten und kostengünstigen Herstellung der Immobilisate stehen als Nachteile die mechanische Instabilität und ein möglicher Aktivitätsverlust durch die Vernetzung entgegen. Infolge der mit der Partikelgröße wachsenden Diffusionsbehinderung können im Innern liegende Enzymmoleküle ihre katalytische Aktivität nicht mehr ausüben [146].

Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Einschlußverfahren mittels Membranen führt der *Matrixeinschluß* zu einem Biokatalysator, der in einem Gel fixiert ist. Hierbei wird das Enzym in dem partikel- oder filmförmigen Netzwerk eines gelbildenden Polymers eingeschlossen, das für das Substrat und Produkt durchlässig ist. Agar, Gelatine, Alginat oder Carrageenan stellen nur einige Beispiele für die zahlreichen zum Einschluß eingesetzten Matrices dar. Wie auch bei der Quervernetzung sind die auf diese Weise gewonnenen Immobilisate sehr weich und unterliegen ebenso einer Diffusionsbehinderung [146].

Die Fixierung eines Enzyms auf einem festen Träger (Carrier) kann über adsorptive, ionische oder kovalente Bindungen erfolgen [146, 147, 148]. Die *Adsorption* beruht auf nichtspezifischen physikalischen Wechselwirkungen (z. B. hydrophobe Bindung, Wasserstoffbrückenbindung) zwischen Enzym und Adsorbens, wobei sowohl anorganische Materialien auf der Basis von Silicium- und Aluminiumoxiden oder Aktivkohle als auch organische Stoffe (Polymere) zum Einsatz kommen.

Bei der *ionischen Bindung* wird das Enzym aufgrund der elektrostatischen Anziehung zwischen entgegengesetzt geladenen ionischen Gruppen des Biokatalysators und des Trägers immobilisiert. Da die Bindungsenergien bei der adsorptiven (hydrophobe Bindung: $1-3 \text{ kcal mol}^{-1}$, Wasserstoffbrückenbindung: $2-10 \text{ kcal mol}^{-1}$) und ionischen Immobilisierung (Ionenbindung: $10-20 \text{ kcal mol}^{-1}$) im Vergleich zur kovalenten Bindung ($30-100 \text{ kcal mol}^{-1}$) verhältnismäßig gering sind [145], kann sehr leicht eine Desorption des Enzyms vom Träger stattfinden, was aber auch nach Verlust der katalytischen Aktivität eine einfache Regeneration des Trägermaterials erlaubt.

Zur Ausbildung einer *kovalenten Bindung* werden funktionelle Gruppen des Enzyms wie z. B. Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl- oder Sulfhydrylgruppen, soweit sie zugänglich sind, mit geeigneten reaktiven Gruppen am Träger verknüpft. Es kommen jedoch für

die Kupplung nur solche chemischen Reaktionen in Betracht, die in wäßriger Lösung unter milden Bedingungen ablaufen, damit die Aktivität des Enzyms möglichst nicht geschädigt wird. Als wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens ist infolge der höheren Festigkeit der Bindung die geringe Ablöserate des Enzyms vom Träger anzusehen. Allerdings kann die kovalente Kupplung mit einer stärkeren Konformationsänderung des Enzyms verbunden sein, die einen größeren Verlust an katalytischer Aktivität nach sich ziehen kann [146].

3.3.3. Kovalente Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase

Die Hydroperoxid-Lyase wurde kovalent auf unterschiedlichen, kommerziell erhältlichen Gelen immobilisiert. Obwohl die kovalente Immobilisierung im Vergleich zu den anderen Methoden häufig aufwendiger und kostenintensiver ist, wurde bei diesem Verfahren infolge der festeren Bindung ein geringerer Proteinverlust erwartet, der in Anbetracht der niedrigen Konzentration der Hydroperoxid-Lyase unbedingt zu vermeiden war.

Diese niedrige Enzymkonzentration war auch der Grund dafür, daß die Immobilisierung nicht mit der mittels IEC partiell aufgereinigten Lyase, sondern direkt mit dem Solubilisat durchgeführt wurde. Zwar gelang mit der IEC die Abtrennung der Hydroperoxid-Lyase von einem anderen Enzym, das ebenfalls das Hydroperoxid metabolisierte (vgl. 2.8.2.2.), aber die nach deren Immobilisierung erhaltene minimale Produktkonzentration war für eine Charakterisierung der Gele sowie für weitere Untersuchungen nicht geeignet (vgl. 2.9.). Nachfolgend sind die verwendeten Gele kurz beschrieben (Abb. 3-4 bis 3-7).

UltraLink Iodoacetyl kuppelt Enzyme bevorzugt über deren Sulfhydrylgruppen, wenn das Gel nur in geringem molaren Überschuß vorliegt, weil diese das Iod schneller als Aminogruppen substituieren (Abb. 3-4). Da jedoch weder der Anteil der Hydroperoxid-Lyase am Gesamtprotein noch deren Cysteingehalt bekannt waren und somit das Gel nicht genau dosiert werden konnte, erfolgte die Kupplung wahrscheinlich über beide funktionelle Gruppen des Enzyms.

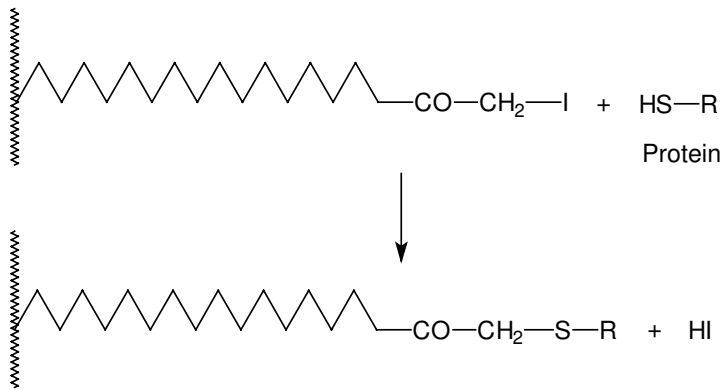


Abb. 3-4: UltraLink Iodoacetyl.

Im Vergleich dazu reagieren *Affi-Gel 10* und *Affi-Gel 15* mit primären Aminogruppen von Proteinen. *Affi-Gel 10* wird vor allem zur Immobilisierung von neutralen und basischen Proteinen eingesetzt, da infolge Hydrolyse einiger aktivierter Ester die Gelpartikel eine negative Ladung aufweisen, die bei einem Kupplungs-pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes (pI) anziehend auf das Enzym (positive Ladung) wirken, was eine verbesserte Kupplung mit den verbleibenden reaktiven Gruppen des Gels ermöglicht (Abb. 3-5).

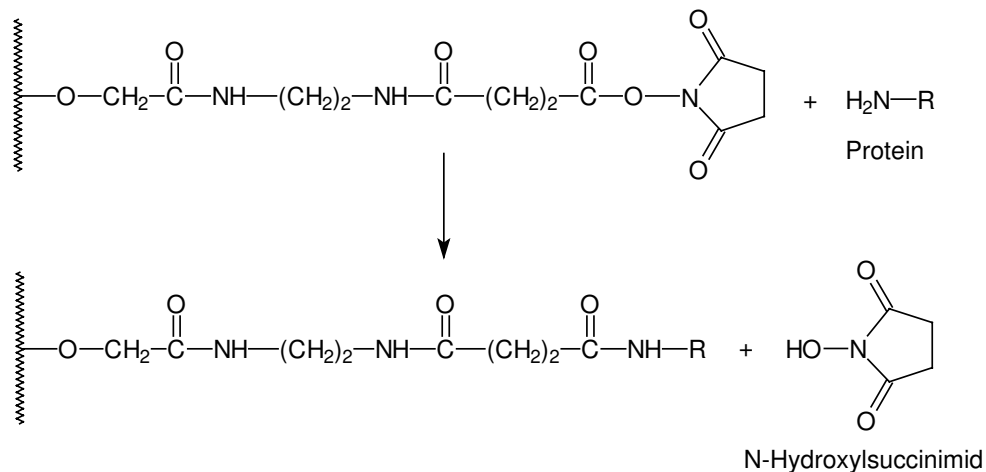


Abb. 3-5: Affi-Gel 10.

Affi-Gel 15 ist im Vergleich dazu eher für saure Proteine (pI < 6,5) geeignet, da bei einem Kupplungs-pH-Wert oberhalb des pI das negativ geladene Protein von der positiven Ladung des tertiären Amins im Spacer elektrostatisch angezogen wird, was die nachfolgende Kupplung mit dem reaktiven Ester beschleunigt (Abb. 3-6). Sowohl beim *Affi-Gel 10* als auch beim *Affi-Gel 15* können Sulfhydrylgruppen mit den Aminogruppen um die aktivierten Gruppen des Gels konkurrieren.

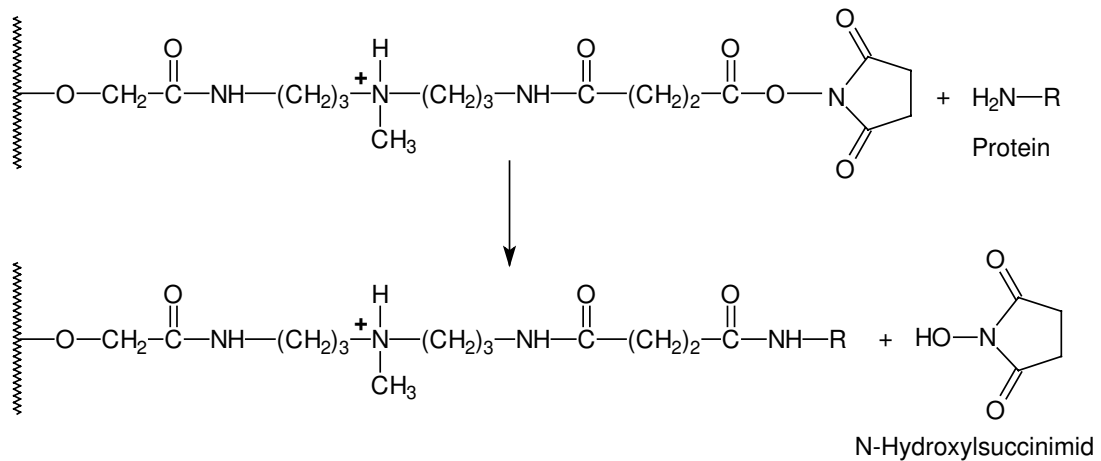


Abb. 3-6: Affi-Gel 15.

Durch nucleophilen Angriff von Aminogruppen auf den Carbonylkohlenstoff erfolgt beim *UltraLink Biosupport Medium* unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung die Öffnung des Azlacton-Ringes (Abb. 3-7). Hierbei tritt im Gegensatz zu den anderen Gelen keine Abgangsgruppe auf, die unter Umständen die Aktivität des Enzyms beeinträchtigen könnte.

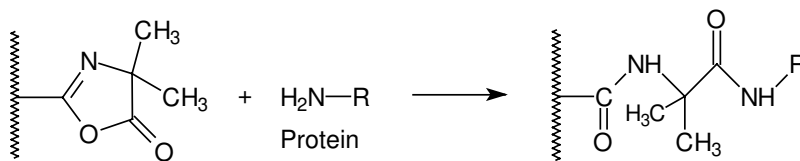


Abb. 3-7: UltraLink Biosupport Medium (Azlacton-Gruppe).

Die Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnenkeimlingen war mit allen der untersuchten Gelen möglich (vgl. 2.9.1.), womit erstmalig die Immobilisierung dieses membrangebundenen Enzyms aus einer höheren Pflanze gelang. Bisher wurde nur die lösliche Lyase aus einzelligen Grünalgen kovalent immobilisiert [139, 140].

Zwischen den einzelnen Gelen ergaben sich beträchtliche Unterschiede in der Aktivitäts- und Kupplungseffizienz, von denen erstere der entscheidende Parameter war, da die Kupplungseffizienz aufgrund des geringen Anteils der Hydroperoxid-Lyase am Gesamtprotein nur wenig Aussagekraft besaß. UltraLink Iodoacetyl war im Hinblick auf die Aktivitätseffizienz mit Abstand das beste Gel (47 %), gefolgt von Affi-Gel 15 mit einer Aktivitätseffizienz von 19 % und UltraLink Biosupport Medium (Azlacton) mit nur

2,5 % (vgl. 2.9.1.). Affi-Gel 10 ergab in Vorversuchen ein schlechteres Resultat als Affi-Gel 15 und wurde daher in diesen Vergleich nicht mehr mit aufgenommen.

Die Aktivitätseffizienz der Immobilisierung wird nicht nur von der Reaktivität der funktionellen Gruppen oder der Funktionalität (Anzahl der reaktiven Gruppen) des Gels maßgeblich bestimmt, sondern auch von der Art des Trägermaterials selbst. So können ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen sowie die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Enzym und Trägeroberfläche eine Veränderung der Tertiärstruktur induzieren, die einen Verlust der Enzymaktivität zur Folge haben kann. Hier schafft die Einführung eines die reaktive Gruppe tragenden „Abstandhalters“ (Spacer) oft Abhilfe, der einen unmittelbaren Kontakt des Enzyms mit der Trägeroberfläche vermeidet.

Der Vergleich von Affi-Gel 15 mit Azlacton, die beide Proteine über Aminogruppen kuppeln, ergab für Azlacton, obwohl es mit $31,3 \mu\text{mol mL}^{-1}$ Gel eine mehr als doppelt so hohe Funktionalität aufweist wie Affi-Gel 15 ($15 \mu\text{mol mL}^{-1}$ Gel) (vgl. 4.1.5.), eine wesentlich geringere Aktivitätseffizienz (vgl. Abb. 2-36). Da die Kupplungseffizienz des Azlactons nur um den Faktor 1,5, die Aktivitätseffizienz dagegen um den Faktor 7,6 schlechter war als beim Affi-Gel 15, bestand hierin nicht die alleinige Ursache für die niedrige Aktivität des Azlacton-Immobilisates. Vorstellbar war vielmehr, daß der Abstand zwischen Hydroperoxid-Lyase und der Oberfläche des Trägers zu klein war (Abb. 3-7), so daß entweder der Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum des Enzyms sterisch behindert war oder daß infolge von Wechselwirkungen mit dem Bisacrylamid/Azlacton-Copolymer eine Konformationsänderung den Verlust der katalytischen Aktivität zur Folge hatte. Möglicherweise beugte der Spacer des Affi-Gels 15 diesen Problemen vor (Abb. 3-6), woraus die größere Aktivitätseffizienz resultierte.

UltraLink Iodoacetyl, das aus dem gleichen Polymer-Grundgerüst wie das Azlacton besteht, besitzt als Spacer einen langen unpolaren Alkylrest mit reaktiver Iodacetylgruppe, während der polare Spacer des Affi-Gels 15 über die Amidbindungen Wasserstoffbrücken mit dem Protein ausbilden kann und zudem noch positiv geladen ist. Nicht nur der Spacer, sondern auch die (quervernetzte) Agarose-Matrix verleihen dem Affi-Gel 15 insgesamt einen sehr hydrophilen Charakter, der unter Umständen die Annäherung des hydrophoben Membranproteins und die nachfolgende Kupplungsreaktion erschwerte, so daß die Immobilisierung mit UltraLink Iodoacetyl am besten verlief.

Generell muß zu der Immobilisierung angemerkt werden, daß ein Vergleich der Aktivitätseffizienz zwischen den einzelnen Experimenten nur bedingt zulässig ist. Jedes zur Immobilisierung eingesetzte Solubilisat enthielt neben tatsächlich solubilisiertem Enzym noch einen Anteil partikelgebundener Lyase, die beim Abpipettieren des Zentrifugationsüberstandes durch ein Aufwirbeln von kleinen Partikeln unvermeidlich in das Solubilisat gelangte, aber durch Membranfiltration (0,45 µm) nicht abgetrennt werden konnte. Diese Partikel, die bei chromatographischen Trennschritten (IEC, HAC) nicht retardiert wurden, waren für das erste der zwei erhaltenen Aktivitätsmaxima verantwortlich und konnten bei der Ultrafiltration (100 kDa) der Fraktionen als kleine grüne Partikel auf der Trennmembran optisch leicht erkannt werden. Eine Ultrafiltration des Solubilisates war mit den Ultrafiltration-Zentrifugationseinsätzen praktisch nicht durchführbar, da bereits nach kurzer Zeit die Membran vollständig verstopft war. Da diese partikelgebundene Lyase ebenso wie die solubilierte Lyase zu der gesamten Enzymaktivität in dem Solubilisat beitrug, aber einer Immobilisierung nicht zugänglich war, beeinflusste dieser variable Anteil auch die Aktivitätseffizienz.

Zur Verbesserung der Kupplung der Hydroperoxid-Lyase an UltraLink Iodoacetyl wurden einige Parameter untersucht (vgl. 2.9.2.), von denen der pH-Wert und die Detergenzkonzentration den größten Einfluß ausübten. Entgegen den allgemeinen Instruktionen des Herstellers, der eine Kupplung im Alkalischen empfahl, erwies sich für die Hydroperoxid-Lyase ein pH-Bereich von 6-7 in bezug auf größtmöglichen Erhalt der Aktivität am günstigsten (vgl. 2.9.2.2.), was mit dem pH-Optimum des Enzyms (vgl. 2.4.1.) und den Ergebnissen aus den Versuchen zur pH-Stabilität (vgl. 2.8.4.) korrespondierte. Offensichtlich wurde in diesem pH-Bereich die Hydroperoxid-Lyase in einer Konformation immobilisiert, die einen optimalen Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum und Umsatz gewährleistete.

Im Vergleich zum pH-Wert beeinflusste die Detergenzkonzentration die Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase noch stärker. So war in 2.9.2.4. die Aktivitätseffizienz bei Konzentrationen $\leq 0,1$ % Triton X-100R (bzw. X-100R-PC) mit 70-76 % maximal, während sie sich bei höheren Konzentrationen zum Teil bis auf ≤ 10 % verringerte. Da die CMC selbst bei 0,1 % deutlich überschritten wurde (vgl. 3.3.1.), lag das Detergenz in der Lösung nicht als Monomer vor, sondern bildete Mizellen von ca. 90 kDa aus [29]. Möglicherweise drangen diese Mizellen in die poröse Gelstruktur des UltraLink Iodoacetyls ein und verschlechterten die Kupplung zum einen dadurch, daß sie die Diffusion der Hydroperoxid-Lyase, die als hydrophobes Membranprotein ebenfalls mit einer Detergenzschicht umgeben war, behinderten und zum anderen, indem sie die unpolare

ren Alkyl-Spacer mit der reaktiven Iodacetylgruppe mit einer Detergenzschicht bedeckten und so vor dem Enzym abschirmten. Dieser Effekt war bei höheren Detergenzkonzentrationen vermutlich stärker ausgeprägt, so daß hieraus die geringe Aktivitätseffizienz resultierte.

Überraschend war hingegen die Beobachtung, daß trotz einer Detergenzkonzentration von 0,3 % Triton X-100R mit zunehmender Proteinmenge im Immobilisierungsansatz die Aktivitätseffizienz von 4,8 % (Protein_{aufg.}: 3,25 mg mL⁻¹ Gel) auf 20,8 % (Protein_{aufg.}: 9,76 mg mL⁻¹ Gel) anstieg (vgl. 2.9.2.3.). Womöglich wurde unter diesen Bedingungen durch die größere Anzahl von Proteinmolekülen, die je nach ihrer Hydrophobizität mit dem Detergenz umhüllt wurden, die mizellare Konzentration an Triton X-100R verringert. Dies könnte eine verminderte Wechselwirkung der Mizellen mit dem Gel zur Folge gehabt haben, so daß die Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase bei höherer Proteinkonzentration effizienter stattfand.

Die geringe Aktivitäts- und Kupplungseffizienz, die bei der Durchführung der Immobilisierung bei +4 °C festgestellt wurde (vgl. 2.9.2.1.), war vermutlich nicht ausschließlich auf eine Verlangsamung der Kupplungsgeschwindigkeit bei niedrigen Temperaturen zurückzuführen, sondern konnte auch durch die hohe Konzentration an Triton X-100R (0,5 %) bedingt sein.

Nach Optimierung der Kupplungsbedingungen konnten als bestes Resultat 87 % der eingesetzten Hydroperoxid-Lyase immobilisiert werden, wobei die Immobilisierung unter einer leichten Zunahme der spezifischen Aktivität erfolgte (vgl. Abb. 2-39). Allerdings war die Gesamtaktivität der Immobilisate aufgrund der geringen Enzymmenge in dem Solubilisat mit maximal 1,3 U mL⁻¹ Gel relativ niedrig (vgl. Abb. 2-41), was laut der Aktivitätsdefinition einer Produktbildungsrate von 1,3 µmol (130 µg) Hexanal pro Minute entsprach.

3.3.3.1. Stabilität und Produktivität immobilisierter Hydroperoxid-Lyase

Da das primäre Ziel der Enzymimmobilisierung vor allem in der Erhöhung der Stabilität und der damit verbundenen Möglichkeit einer wiederholten Nutzung des Biokatalysators besteht, wurde die immobilisierte Hydroperoxid-Lyase mit dem Solubilisat im Hinblick auf ihre Operationsstabilität (vgl. 2.9.3.), Temperaturstabilität (vgl. 2.9.4.) sowie Lagerstabilität (vgl. 2.9.5.) verglichen.

Operationsstabilität

Die Operationsstabilität der Immobilisate, d. h. deren Stabilität unter Bedingungen des wiederholten Einsatzes, war stark von der Substratkonzentration abhängig (vgl. 2.9.3.1.). So nahm im Verlauf von drei Inkubationsphasen bei einer Konzentration von 1.234 μM 13-HPOD die relative Aktivität auf 35,8 % ab, während bei 55 μM 13-HPOD noch 72,9 % des Enzyms in katalytisch aktiver Form vorlagen. Die Anfangsaktivität (1. Zyklus) verringerte sich nach einem Maximum bei 411 μM mit zunehmender Substratkonzentration. Da vor jedem erneuten Inkubationszyklus die Immobilisate mit frischem Puffer konditioniert wurden, wobei sowohl die gebildeten Produkte als auch verbleibendes Substrat entfernt wurden, waren diese Beobachtungen ein Hinweis auf eine irreversible Inhibierung der Hydroperoxid-Lyase.

Durch den Zusatz verschiedener Additive zum Inkubationspuffer, der das Substrat enthielt, konnte der starke Aktivitätsverlust nicht verhindert werden (vgl. 2.9.3.2.-2.9.3.5.). Als einziges Additiv besaß DTT eine stabilisierende Wirkung, da die relative Aktivität bei wiederholter Inkubation im Vergleich zu einer Kontrolle um den Faktor 1,8-2,3 höher war (vgl. 2.9.3.5.). Dies deutete darauf hin, daß der reduzierte Status eventuell an der Katalyse beteiligter Sulfhydrylgruppen durch das Thiol aufrecht erhalten wurde.

Im Gegensatz dazu führte Cystein zu einem fast vollständigen Verlust der Enzymaktivität. Dies war insofern überraschend, als daß in einem Vergleich zweier Immobilisate, von denen das eine nach erfolgter Immobilisierung der Lyase unter Blockierung zurückbleibender reaktiver Gruppen des UltraLink Iodoacetyls mit Cystein hergestellt worden war (vgl. 4.7.1.), keine Unterschiede hinsichtlich der Aktivität festgestellt wurden. Offensichtlich war die gleichzeitige Anwesenheit von Cystein und Hydroperoxid während der Katalyse für die Inaktivierung verantwortlich. Eine Reduktion des Hydroperoxids durch das in ca. 50-fachem molaren Überschuß vorliegende Cystein, die eine Verarmung der Lösung an Substrat und Verringerung der Produktmenge zur Folge haben und somit eine scheinbare Inaktivierung des Enzyms vortäuschen konnte, schien nicht zuzutreffen. DTT weist gegenüber Cystein ein um 0,12 V negativeres Redoxpotential auf [141], so daß aufgrund der größeren Reduktionswirkung des DTT ebenfalls eine so drastische (scheinbare) Verminderung der Enzymaktivität hätte eintreten müssen.

Auch bei anderen Pflanzen wie z. B. Tomaten [93] und Tee [149] wurde eine irreversible Inhibierung der Hydroperoxid-Lyase beobachtet: eine Dialyse des inaktivierten

Enzyms nach Inkubation mit dem Hydroperoxid konnte die Aktivität nicht wiederherstellen. Für die Inhibierung wurden das Substrat, aber nicht die gebildeten Produkte verantwortlich gemacht. Dies deckte sich mit Ergebnissen eigener Experimente, in denen festgestellt wurde, daß ein Zusatz von 2*E*-Hexenal vor der Zugabe von 13-HPOT dessen Umsatz nicht beeinträchtigte (vgl. 2.4.6.).

Ein mechanistischer Erklärungsansatz beinhaltet die Inhibierung der Hydroperoxid-Lyase durch eine Konversion des Hydroperoxids zu reaktiven Peroxy- oder Alkoxyradikalen, die eine Modifikation des aktiven Zentrums und somit einen Verlust der katalytischen Aktivität bewirkten [149]. Basierend auf zahlreichen Inhibierungsstudien wurden als möglicher Angriffsort im aktiven Zentrum Sulfhydrylgruppen der Aminosäure Cystein vermutet [27, 67, 89]. Da der Einsatz von Antioxidantien ebenfalls die Enzymaktivität hemmte [27, 67], war das Auftreten von radikalischen Intermediaten während der Katalyse durchaus vorstellbar. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuche mit verschiedenen Antioxidantien bestätigten dies zunächst nicht, was auf die geringe Konzentration von 0,05 mM zurückgeführt wurde (vgl. 2.9.3.2.). Um eine merkliche Inhibierung (ca. 47 %) festzustellen, waren 0,5 mM NDGA erforderlich.

Trotz der seit über zwei Jahrzehnte andauernden intensiven Untersuchung dieses Enzyms konnte der Mechanismus der Hydroperoxidspaltung bislang noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt werden, wobei insbesondere darüber Unklarheit herrscht, ob die Spaltung der Hydroperoxidgruppe homolytisch oder heterolytisch erfolgt (Abb. 3-8) [1, 12, 28, 84, 150].

Generell können Cytochrom P450 Enzyme, zu denen auch die Hydroperoxid-Lyase zählt, in Abhängigkeit von dem jeweiligen Enzym beide Arten der Spaltung katalysieren [151, 152, 153, 154]. Allerdings muß bei der heterolytischen Spaltung (Abstraktion eines Hydroxid-Ions) das Enzym als Lewis Säure fungieren, was aufgrund der starken Elektronen-Donor-Wirkung [155] des Cystein-Liganden [84] des Häm *b* als unwahrscheinlich angesehen wird.

Im Gegensatz dazu umfaßt die homolytische Spaltung des Hydroperoxids die Oxidation des Eisens unter Bildung eines Eisen-Hydroxyl-Komplexes, der nach Umlagerung des Alkoxyradikals das ungepaarte Elektron aufnimmt und hierbei ein Hydroxid-Ion freisetzt. Es sei hier nur am Rande angemerkt, daß der hier vorgestellte homolytische Mechanismus mit dem der Allenoxid-Synthase (vgl. 3.4.3.), einem anderen Cytochrom

P450 Enzym, identisch ist, welcher zusätzlich noch die Abspaltung eines Protons und somit die Bildung eines instabilen Allenoxids beinhaltet [156].

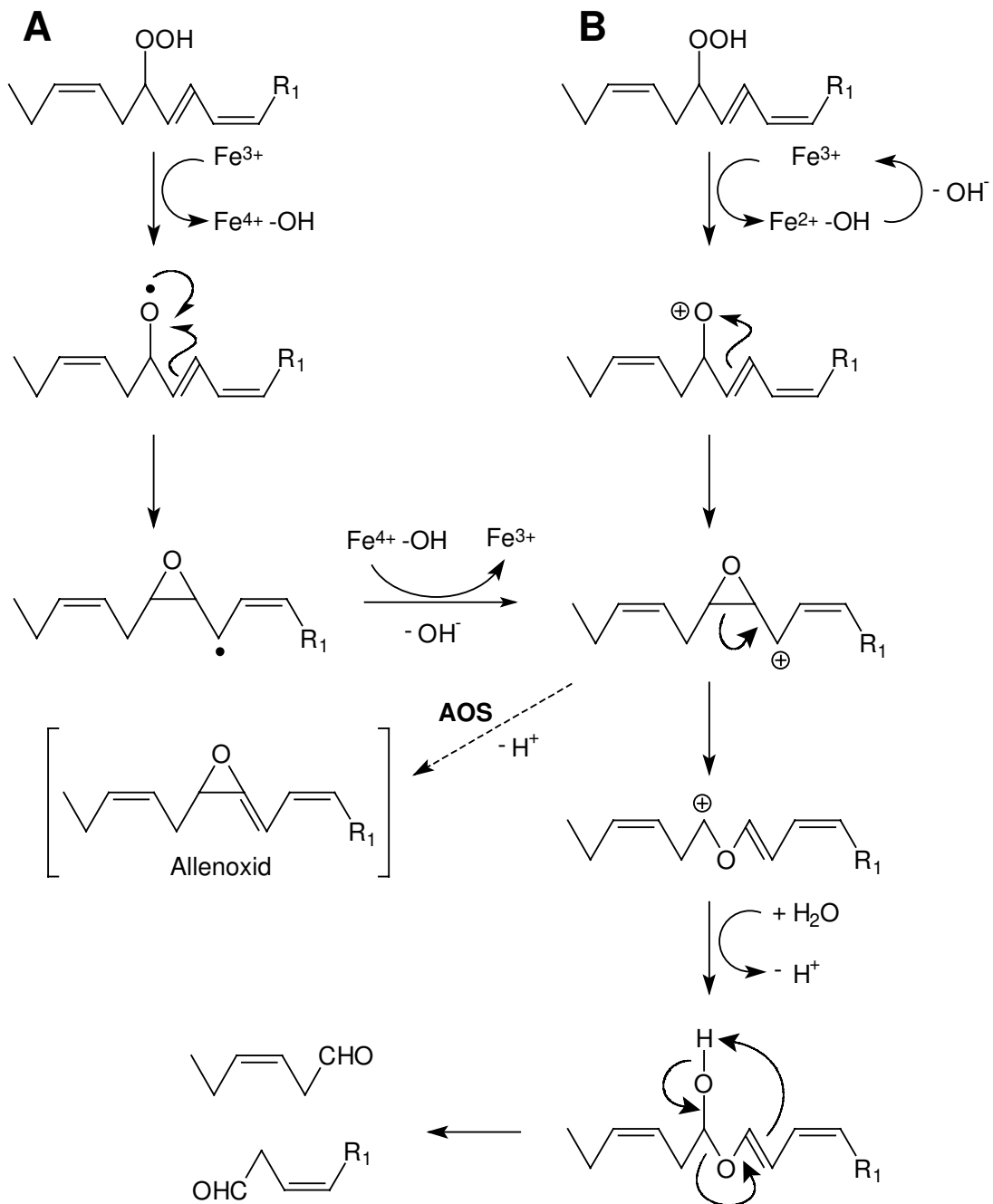


Abb. 3-8: Hypothetischer Mechanismus der Hydroperoxid-Lyase: Homolytische (A) und heterolytische (B) Spaltung von 13-HPOT. R₁ = (CH₂)₇COOH, AOS: Allenoxid-Synthase.

Ungeachtet des anfänglichen Schrittes tritt bei beiden Mechanismen ein Epoxy-Carbokation auf, in dem die positive Ladung am C₁₁ lokalisiert ist. Nach Umlagerung in ein Ether-Carbokation leitet die Addition von Wasser die Spaltung zu 3Z-Hexenal und 12-Oxo-9Z-dodecensäure ein. Durch Markierungsexperimente mit [¹⁸O]-markiertem Sub-

strat konnte bewiesen werden, daß ein Sauerstoffatom der Hydroperoxidgruppe in der ω -oxo-Carbonsäure verbleibt, während der Sauerstoff des Aldehyds aus dem Wasser stammt [157, 158].

Zwar sind Reaktionen von Hydroperoxy-Fettsäuren mit Proteinen und Aminosäuren wie z. B. oxidative Veränderungen von Aminosäuren (u. a. Cystein), Addukt-Bildung [159, 160] oder Protein-Quervernetzung (Crosslinking) wohl bekannt [161, 162, 163, 164], ob aber im Fall einer homolytischen Spaltung das im aktiven Zentrum gebildete Alkoxy- oder Hydroxylradikal die Inhibierung der Hydroperoxid-Lyase verursachte, ist nicht sicher. Zur Klärung dieser Hypothese müßte ermittelt werden, ob diese als freie Radikale auftreten oder an das Häm komplex-gebunden vorliegen. Im Fall von freien Radikalen könnte bereits die Umsetzung eines einzigen Substratmoleküls zu einem Aktivitätsverlust führen, indem diese mit empfindlichen Aminosäuren (z. B. Cystein, Histidin, Methionin, Lysin, Tyrosin, Tryptophan) abreagieren, was der wichtigen Aufgabe des Enzyms, nämlich der Bildung von physiologisch aktiven Verbindungen zur Abwehr von Phytopathogenen (vgl. 3.1.1.), nicht gerecht würde. Zum anderen sind vermutlich die Radikale und der Cystein-Ligand des Häm *b* durch das Porphyrin-Ringsystem räumlich voneinander getrennt, so daß ein direkter Kontakt nicht zustande kommt.

Hinzu kommt noch, daß beispielsweise die Hydroperoxid-Lyase aus Tomaten [93] und Tee [149] nicht nur durch Hydroperoxy-Fettsäuren inhibiert wurde, die von dem Enzym umgesetzt wurden (13-HPOT, 13-HPOD), sondern auch durch die Hydroperoxide, die nicht gespalten wurden wie z. B. 9-HPOT, 9-HPOD, 9- γ -HPOT und 13- γ -HPOT. Vor diesem Hintergrund erscheint die Vermutung, daß die Lyase im Verlauf des normalen katalytischen Zyklus inaktiviert wird, eher unwahrscheinlich.

MATSUI et al. schlagen als alternativen Inhibierungsmechanismus vor, daß das Hydroperoxid *in der Nähe* des aktiven Zentrums in ein Radikal transformiert wird, das nachfolgend eine Sulfhydrylgruppe schädigt, die für die katalytische Aktivität des Enzyms von Bedeutung ist [149]. Sie konnten jedoch diese Hypothese bislang weder durch Identifizierung der modifizierten Aminosäure noch durch Detektion von freien Radikalen bestätigen.

Die Beteiligung der Hydroperoxidgruppe an der Inaktivierung ist scheinbar gesichert, da eine Reduktion des Hydroperoxids zum entsprechenden Alkohol die inhibierende Wirkung drastisch verringerte [93, 149]. Allerdings konnte die Inhibierung nicht voll-

ständig verhindert werden (75-90 % Restaktivität des Enzyms). Überraschend ist auch die Beobachtung, daß die Methylierung von 13-HPOT dessen inaktivierende Wirkung nahezu aufhob [93], was die Frage aufwirft, ob es aufgrund der veränderten Polarität des Carboxyl-Endes tatsächlich in die Nähe des aktiven Zentrums gelangte und dort eine Schädigung hervorrufen konnte.

Es sei nur kurz darauf hingewiesen, daß zahlreiche Beispiele zur Suizid-Inhibierung (Suicide Inhibition) von Cytochrom P450 Enzymen in Monooxygenase Reaktionen existieren [165]. Hierbei werden bestimmte Substrate (Suicide Substrates) während der Katalyse zu reaktiven Intermediaten umgesetzt, die anschließend das Enzym irreversibel inaktivieren. Die Arten der Enzymmodifikation sind vielfältig und umfassen die irreversible Bindung der Metabolite an das Apoenzym, (quasi-) irreversible Bindung an das Eisen des Häm, Alkylierung des Häm sowie Verlust des Häm [165, 166]. Das Auseinanderbrechen des Eisen-Sauerstoff-Komplexes kann zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies wie Hydroxyl- oder Superoxidradikalen führen, die aufgrund ihrer Reaktivität in biologischen Systemen verheerende Schäden hervorrufen [167, 168, 169, 170]. Inwieweit dies auch bei der Hydroperoxid-Lyase zutrifft, bedarf weiterer Klärung.

Thermische Stabilität

Sowohl in immobilisierter, wie auch in löslicher Form erwies sich die Hydroperoxid-Lyase als thermisch verhältnismäßig instabil (vgl. 2.9.4.), was auch bei solubilisierter Hydroperoxid-Lyase aus Gurken [87] oder Sojakeimlingen [30] beobachtet wurde, die nach 5 min bei 50 °C 50 % bzw. 80 % ihrer Anfangsaktivität einbüßten. Bei der solubilisierten Lyase aus Mungbohnen nahm im Verlauf einer 30-minütigen Lagerung bei 40 °C die Aktivität nur um ca. 10-20 % ab, während bei 60 °C der Aktivitätsverlust bereits über 60 % lag. Eine leicht erhöhte Stabilität des Immobilisates gegenüber dem Solubilisat konnte erst ab 40 °C festgestellt werden; hingegen war bei niedrigeren Temperaturen die Aktivität annähernd vergleichbar. Offensichtlich wurde durch die Immobilisierung des Enzyms die Stabilität nicht soweit erhöht, daß eine thermisch bedingte Konformationsänderung oder Dissoziation der Untereinheiten verhindert wurde.

Lagerstabilität

Die Stabilität der Hydroperoxid-Lyase während der Lagerung (+4 °C) konnte durch die Immobilisierung deutlich gesteigert werden (vgl. 2.9.5.). So betrug die relative Aktivität des Immobilisates nach 18 d 86 %, während im Solubilisat nur noch 32 % des Enzyms aktiv waren. Die Verlangsamung des Aktivitätsverlustes beim Solubilisat gegen Ende

des Untersuchungszeitraumes wurde auf den Anteil noch partikelgebundener Lyase im Solubilisat zurückgeführt. Vermutlich verlor zunächst das tatsächlich solubilisierete Enzym rasch an Aktivität, während es in nativer Umgebung (d. h. membrangebunden) stabiler war und so zwischen dem 8-18. d eine verhältnismäßig konstante relative Aktivität von ca. 41-32 % ergab.

Voraussetzung für den Erhalt der Aktivität war allerdings, daß kein Natriumazid zur Konservierung verwendet wurde. Als stark nucleophiles Reagenz bewirkte dieses in einer Konzentration von 0,01 % eine rasche Abnahme der Enzymaktivität. Im Vergleich zum Solubilisat, das nach 8 d inaktiv war, blieb beim Immobilisat eine Restaktivität von ca. 40 % erhalten. Da das Azid-Anion beim Immobilisat zusätzlich noch das Iod des UltraLink Iodoacetyls (keine Blockierung zurückbleibender reaktiver Gruppen nach der Immobilisierung) nucleophil substituieren konnte, war offensichtlich nach 4 d das gesamte Azid verbraucht, so daß es zu einer weiteren Inaktivierung des Enzyms nicht mehr zur Verfügung stand.

Ohne Natriumazid konnte der Aktivitätsverlust solubilisierter Hydroperoxid-Lyase möglicherweise durch proteolytische Degradation verursacht sein, da die Anwesenheit von Proteinase nicht ausgeschlossen war und Proteinase-Inhibitoren wie z. B. PMSF aufgrund dessen inhibierenden Effektes (vgl. 2.8.4.) nicht eingesetzt wurden. Außerdem trat mit der Zeit in dem Solubilisat eine merkliche Trübung auf, was auf eine Aggregation von Proteinen oder auf mikrobiellen Befall hindeutete.

Vor dieser Art von Problemen war die immobilisierte Hydroperoxid-Lyase wesentlich besser geschützt. Falls während der Kupplung Proteinase gleichermaßen mit der Hydroperoxid-Lyase immobilisiert worden waren, so wurde durch deren Fixierung am Gel ein unmittelbarer Kontakt zwischen beiden Enzymen verhindert. Aus dem gleichen Grund konnte auch eine Aggregation der Hydroperoxid-Lyase nicht stattfinden, so daß hieraus insgesamt eine höhere Lagerstabilität des Immobilisates resultierte.

Produktivität

In bezug auf die Produktivität war das Immobilisat dem Solubilisat leicht überlegen (vgl. 2.9.6.), was vermutlich darauf zurückzuführen war, daß die Inkubation des Solubilisates mit 13-HPOT unvermeidbar in Gegenwart von Triton X-100R durchgeführt wurde, auf dessen inhibierende Wirkung bereits unter 3.2.5. eingegangen wurde. Die mit dem Immobilisat erzielten Produktmengen (Summe 3Z-/2E-Hexenal) befanden sich allerdings mit 37 mg kg⁻¹ bzw. 49 mg kg⁻¹, bezogen auf 1 kg Keimlinge, bedeutend unter

den maximalen Produktkonzentrationen der Homogenate und Rohextrakte, die bei Verwendung sehr hoher Substratkonzentrationen teilweise über 1 g kg^{-1} lagen (vgl. 2.4.4., 2.4.5.). Jedoch mußte bei diesem Vergleich berücksichtigt werden, daß die Ausbeute an Hydroperoxid-Lyase bei der Solubilisierung der Membranfraktion in der Regel nur 35-40 % betrug (vgl. 2.8.1.) und daß die Substratkonzentration unter diesen Versuchsbedingungen weitaus geringer war.

Es erscheint erwähnenswert, daß sich bei der Inkubation des Immobilisates mit 13-HPOT das Produktspektrum zugunsten des geruchsintensiveren 3Z-Hexenals (vgl. 3.1.2.) verschob, während in den Homogenaten und Rohextrakten nach 1 h Inkubation ausschließlich 2E-Hexenal vorlag. Die Inkubationsdauer von 15 min war vermutlich hierfür nicht die Ursache, da in 2.4.2. dieser Zeitraum für eine vollständige Isomerisierung ausreichte. Möglicherweise wurde die 3Z/2E-Enal-Isomerase nur zu einem geringen Anteil oder in einer für die katalytische Aktivität ungünstigen Konformation immobilisiert, da in dem Solubilisat die Isomerisierungsrate höher war.

3.4. Metabolismus von 13-HPOT durch weitere Enzyme des Lipoxygenase-Weges

In den meisten Experimenten setzte die Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen ungefähr 40-50 % des Substrates 13-HPOT zu 2E-Hexenal um (vgl. 2.4., 2.5.), wobei unter bestimmten Bedingungen auch höhere Umsatzraten (max. 87,4 %) erzielt wurden (vgl. 2.12.3.). Da mit der bisherigen gaschromatographischen Analytik keine weiteren Produkte zu erkennen waren, bestand Unklarheit über den Verbleib des restlichen Substrates. Von großer Bedeutung war daher die Entwicklung einer geeigneten Methode, die sowohl die Analytik von 13-HPOT als auch von eventuellen nichtflüchtigen Nebenprodukten ermöglichte.

3.4.1. GC-MS-Analytik der Oxylipide

Die gaschromatographische Analytik der C_6 -Verbindungen wurde mit einer polaren Carbowax-Säule durchgeführt, die für diese Substanzen die beste Trennung ergab. Allerdings bestand die Möglichkeit, daß schwer- bzw. nichtflüchtige Nebenprodukte wegen des Temperaturlimits der Säule ($250 \text{ }^\circ\text{C}$) nicht detektiert wurden, da die Proben

ohne Derivatisierung (Überführung in flüchtigere Verbindungen) analysiert wurden. Diese Vermutung wurde dadurch bestätigt, daß nach Methylierung der Proben auf einer unpolaren SE-54 Säule im Vergleich zu einem Blindwert weitere Peaks auftraten, die bislang nicht beobachtet werden konnten (vgl. 2.10.1.). Von diesen gelang lediglich die Identifizierung von 12-Oxo-10*E*-dodecensäure, 13-Hydroxy-9*Z*,11*E*,15*Z*-octadecatriensäure (13-HOT), 12-Oxo-phytodiensäure (12-oxo-PDA) und 12-Oxo-13-hydroxy-9*Z*,15*Z*-octadecadiensäure (12,13- α -Ketol) als Methylester, während die Massenspektren der anderen Peaks wenig aussagekräftig waren.

Die zusätzlich zur Methylierung durchgeführte Darstellung der O-Methyloxim-Derivate (MO) und Trimethylsilylether (TMS) brachte zwar eine Absicherung der bereits identifizierten Verbindungen, aber mit Ausnahme der tendenziell identifizierten 12-Oxo-9-hydroxy-10*E*,15*Z*-octadecadiensäure (9,12- γ -Ketol) keine neuen Erkenntnisse über die noch unbekanntesten Verbindungen (vgl. 2.10.2.). Besonders auffällig war, daß sich in den Chromatogrammen (vgl. Abb. 2-54, 2-60) die Verhältnisse der Peaks stark voneinander unterschieden, obwohl die gleiche Probe zur Derivatisierung verwendet wurde. Während in Abb. 2-54 12-Oxo-10*E*-dodecensäuremethylester unter den Metaboliten dominierte, war in Abb. 2-60 die Summe beider isomeren 12,13- α -Ketol-Derivate um ein Vielfaches größer. Auch im Verhältnis von 12-Oxo-10*E*-dodecensäure zu 12-oxo-PDA traten beachtliche Unterschiede auf.

Diese Beobachtungen konnten beispielsweise mit einer unterschiedlich stark ausgeprägten Ionisierung der Methylester bzw. der methylierten MO-TMS-Derivate in der Ionenquelle des Massenspektrometers erklärt werden, aber auch eine unvollständige Derivatisierung oder hierbei auftretende Verluste kamen in Betracht. Zumindest die Darstellung der MO-Derivate erfolgte im vorliegenden Beispiel nicht quantitativ, da 12-oxo-PDA (Abb. 2-60, Peak: 60,1 min) teilweise noch als Methylester vorlag.

Insbesondere die methylierten Ketole sind ohne zusätzliche Derivatisierung bei der GC-Analytik sehr instabil und bereiten große Probleme [34], die auf eine thermisch verursachte Enolisierung oder Isomerisierung der Doppelbindungen zurückgeführt werden können (Abb. 3-9, 3-10). Ein deutlicher Hinweis auf Umlagerungen war die Peakgruppe bei 74-75,5 min (vgl. Abb. 2-60), die z. T. sehr ähnliche Spektren wie das 12,13- α -Ketol (Peak 6) ergab. Auch bei der Silylierung trat Enolisierung auf, die sich durch di-silylierte Produkte bemerkbar machte, sofern nicht zuvor die Ketogruppe durch Darstellung des MO-Derivates fixiert wurde.

PAN et al. beobachteten ebenfalls das Auftreten mehrerer Peaks bei der GC-MS-Analytik des 12,13- α -Ketols (als Methylester und TMS-Derivat), wogegen nach Hydrierung ein einziger Peak erhalten wurde [171]. Auch SIMPSON und GARDNER berichteten, daß für die Analytik des 12,13- α -Ketols eine aus Methylierung, Hydrierung und Trimethylsilylierung bestehende Derivatisierungsprozedur erforderlich war [172]. Die Keto-Enol Tautomerie von α -Ketolen und deren Redox Eigenschaften wurde von GRECHKIN et al. eingehender untersucht [173].

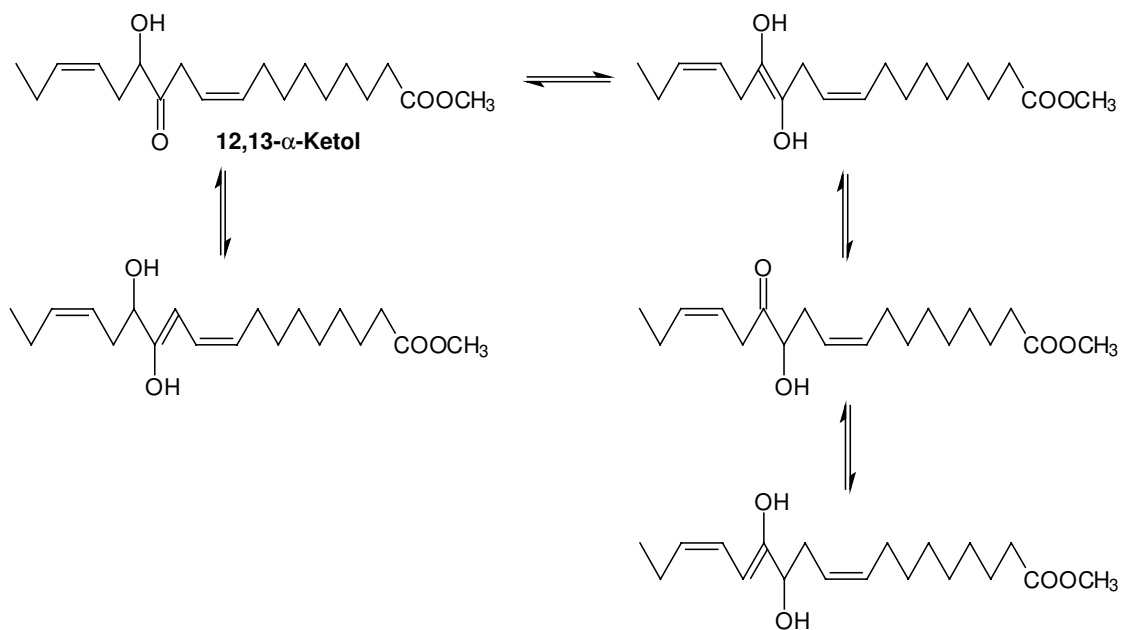


Abb. 3-9: Mögliche Tautomere des 12,13- α -Ketols (Methylester).

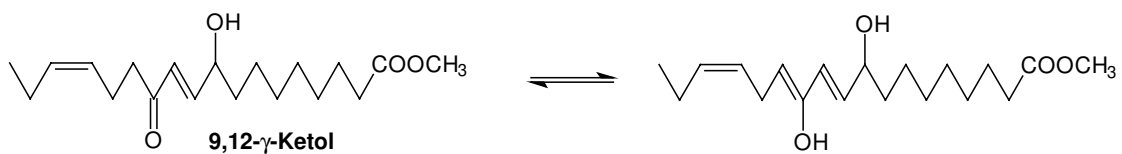


Abb. 3-10: Mögliches Tautomer des 9,12- γ -Ketols (Methylester).

Weiterhin kam erschwerend hinzu, daß das Substrat 13-Hydroperoxy-9Z,11E-15Z-octadecatriensäure nicht unzersetzt gaschromatographierbar war und zahlreiche Artefakte ergab. Eine Reduktion der Hydroperoxidgruppe zum Alkohol erschien nicht angebracht, da auf diese Weise nicht mehr zwischen dem Substrat und 13-HOT, das eventuell bereits vor der Reduktion vorlag, unterschieden werden konnte.

Außerdem isomerisierte *cis*-12-oxo-PDA sehr leicht zu dem stabileren *trans*-Isomer [174], was vor allem bei Split-Injektion festgestellt wurde.

Als Zusammenfassung kann festgehalten werden, daß die qualitative Analytik der Oxylipide mittels Gaschromatographie durchaus möglich war, sofern durch eine geeignete Derivatisierung Maßnahmen gegen Umlagerungen und Artefaktbildung getroffen wurden. Eine zuverlässige quantitative Bestimmung setzte jedoch eine vollständige Derivatisierung der Metabolite und keine Substanzverluste bei den jeweiligen Schritten voraus, was nicht gewährleistet war.

3.4.2. Entwicklung einer HPLC-Methode zur Analytik der Oxylipide

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) erschien als eine hervorragende Alternative zur Gaschromatographie, da eine thermische Belastung der Probe, die zu Umlagerungen und Artefaktbildung der Analyte führte, unterblieb. Allerdings trat bei der HPLC nicht nur die Frage nach einem chromatographischen Trennsystem, sondern vielmehr nach einem geeigneten Detektionssystem auf, das dazu imstande war, auch UV-inaktive Verbindungen zu detektieren. Vor allem das 12,13- α -Ketol, das aufgrund der gaschromatographischen Ergebnisse (vgl. Abb. 2-60) als ein potentiell Hauptprodukt unter den Oxylipiden angesehen wurde, besitzt keine chromophore Gruppe [175].

Die Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, die ein Chromophor in Verbindungen mit Ketogruppe einführt, war unvollständig. Nach Zugabe des in 1 N HCl gelösten Reagenz wurde die Carboxylgruppe der unpolaren Oxylipide protoniert, was eine sofortige Ausfällung der Zielverbindungen nach sich zog. Da auch die Derivatisierung mit Pentafluorbenzylhydroxylamin und nachfolgende Trennung der Pentafluorbenzyl-oxime Probleme aufwarf, wurde von weiteren Derivatisierungen Abstand genommen.

Die Notwendigkeit von chromophoren Gruppen in den Analyten wurde durch Einsatz eines Lichtstreu-Detektors (Evaporative Light-Scattering Detector, ELSD) umgangen. Der ELSD ist ein universeller HPLC-Detektor, der gegenüber dem Brechungsindex-Detektor (RI) zahlreiche Vorteile wie größere Empfindlichkeit, Gradiententauglichkeit und geringe Anfälligkeit gegenüber Temperaturschwankungen besitzt [176, 177]. Haupteinsatzgebiet ist klassischer Weise die Detektion von nichtflüchtigen Verbindungen, deren Detektion mit einem UV-Detektor nicht oder nur unter großem Verlust an Empfindlichkeit möglich ist. Hier sind z. B. Kohlenhydrate [178], Lipide [179], Phospholipide [180, 181], Tocopherole [182], Phytosteroide [183], Detergenzien [184], Polymere und Fettsäuren [176, 177] zu nennen.

Seine Anwendung führte zu der Entwicklung einer neuartigen Oxy lipid-Analytik, die im Gegensatz zu konventionellen GC-Methoden auf eine umfangreiche Derivatisierungsprozedur verzichten konnte [185, 186]. Die Produkte des $^{13}\text{-HPOT}$ -Metabolismus, wie auch das instabile Substrat selbst, konnten in einem einzigen chromatographischen Lauf erfaßt werden. Da nach der mit dem ELSD erfolgten Optimierung der chromatographischen Trennung bei der anschließenden Kopplung der HPLC mit der Particle Beam-Massenspektrometrie (PB-MS) qualitativ identische Chromatogramme erhalten wurden, erwies sich der ELSD sozusagen als ein Pilot-Detektor für die PB-MS (vgl. Abb. 2-67). Dies wurde auf ein vergleichbares Funktionsprinzip des Probeneinlaßsystems, das in beiden Fällen eine Vernebelung des HPLC-Effluenten und eine Evaporation des Lösungsmittels umfaßte, zurückgeführt.

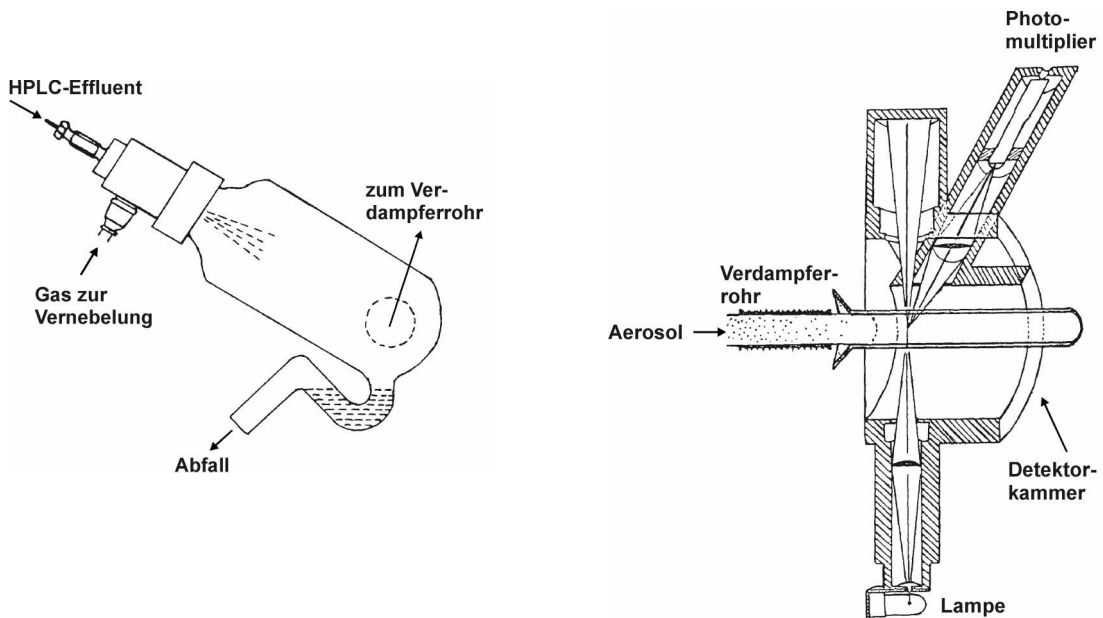


Abb. 3-11: Schematische Darstellung der Vernebler- und Detektionseinheit des ELSD.

Der gesamte Detektionsprozeß mit dem ELSD kann in mehrere Abschnitte unterteilt werden [178]. Zunächst wird der HPLC-Effluent mit einer Venturi-Düse durch Zufuhr eines konzentrischen Gasstromes pneumatisch versprüht (Abb. 3-11). Die größeren der hierbei entstehenden Tröpfchen kondensieren an der Glaswand der Verneblerkammer, während das aus kleineren Tröpfchen bestehende Aerosol in das Verdampferrohr gelangt. Auf diese Weise wird eine relative kleine Tröpfchenverteilung erzielt, die für eine reproduzierbare Analytik wichtig ist. Im Verdampferrohr erfolgt die Evaporation des Lösungsmittels, wobei nichtflüchtige Analytmoleküle als Mikropartikel zurückbleiben. Diese Mikropartikel gelangen nun in die Detektionskammer, wo sie das von einer Halogenlampe emittierte polychromatische Licht streuen. Anschließend wird das Streu-

licht in einem Winkel von 120° (ELSD: Sedex 55) von einem Photomultiplier aufgefangen und verstärkt. Da das gestreute Licht proportional zu der Masse des Analyten ist, kann der ELSD für quantitative Bestimmungen herangezogen werden.

Der Vorgang der Lichtstreuung ist äußerst komplex. In Abhängigkeit von der Partikelgröße können vier Arten der Streuung unterschieden werden [178, 184, 187]. *Rayleigh-Streuung* tritt auf, wenn das Verhältnis des Partikeldurchmessers d zu der Wellenlänge λ des eingestrahlten Lichtes kleiner als 0,1 ist ($d/\lambda < 0,1$). Hier verhält sich das Teilchen als punktförmige Lichtquelle, die jeden absorbierten Lichtquant als Strahlung geringerer Energie in alle Richtungen emittiert. Werden die Partikel dagegen größer ($0,1 < d/\lambda < 1$), so können sie nicht mehr als punktförmige Lichtquelle angesehen werden. Das von ihnen gestreute Licht wird nicht nur von einem, sondern von mehreren Punkten aus abgestrahlt (*Mie-Streuung*). Die Intensität des Streulichtes hängt davon ab, wie die einzelnen Wellen miteinander interferieren (Verstärkung oder Auslöschung). Bei noch größeren Partikeln ($d/\lambda > 1$) beruht die Lichtstreuung auf *Reflexion* und *Refraktion*, die immer gemeinsam vorkommen.

Der Durchmesser d_0 der bei der Vernebelung des HPLC-Effluents auftretenden Tröpfchen wird von vielen Faktoren beeinflusst und kann mit Gleichung 3-1 näherungsweise beschrieben werden, in der σ_l , ρ_l , μ_l die Oberflächenspannung, Dichte und Viskosität des Fließmittels darstellen. $v_g - v_l$ ist die Differenz der Geschwindigkeiten von Gas und Fließmittel (in m s^{-1}) und Q_l/Q_g das Verhältnis der Flußraten von Fließmittel und Gas [184, 188].

$$\text{Gl. 3-1: } d_0 = \frac{585 \sigma_l^{0,5}}{(v_g - v_l) \rho_l^{0,5}} + 597 \left[\frac{\mu_l}{(\sigma_l \rho_l)^{0,5}} \right]^{0,45} \left[\frac{1000 Q_l}{Q_g} \right]^{1,5}$$

In der Regel liegen die Durchmesser der Aerosolteilchen d_0 nach der Vernebelung in der Größenordnung von 4-40 μm und werden bei der Evaporation des Lösungsmittels noch weiter in ihrer Größe reduziert [178]. Unter Vernachlässigung von Präzipitation der Tröpfchen an der Glaswand der Verneblerkammer und Koagulation resultiert hieraus bei einer Dichte des Analyten ρ_A ein durchschnittlicher Partikeldurchmesser d , der der Analytkonzentration c proportional ist (Gl. 3-2) [184].

$$\text{Gl. 3-2:} \quad d = d_0 \left[\frac{c}{\rho_A} \right]^{1/3}$$

So verringert sich, unter der Annahme einer Dichte von 1 g cm^{-3} , beispielsweise bei einer Analytkonzentration von 1 mg L^{-1} der Partikeldurchmesser um den Faktor 100, bei 1000 mg L^{-1} dagegen nur um den Faktor 10. Mit Aerosolteilchen der Größe $d_0 = 4\text{-}40 \text{ }\mu\text{m}$ folgen hieraus Partikeldurchmesser d von $40\text{-}400 \text{ nm}$ ($c = 1 \text{ mg L}^{-1}$) bzw. von $400\text{-}4000 \text{ nm}$ ($c = 1000 \text{ mg L}^{-1}$) nach der Evaporation [178]. Insofern wird verständlich, daß die Rayleigh-Streuung nur bei sehr kleinen Konzentrationen (kleiner Partikeldurchmesser) auftritt, während bei hohen Konzentrationen Reflexion und Refraktion (großer Partikeldurchmesser) dominieren.

Alle Arten der Streuung tragen in unterschiedlichem Maß zu der Intensität des Streulichtes bei. Die Intensität des gestreuten Lichtes I wird durch Gleichung 3-3 ausgedrückt, in der k eine Konstante und N die Anzahl der Partikel darstellen. Die Höhe des Exponenten y verringert sich mit zunehmendem Verhältnis d/λ von 4 (Rayleigh-Streuung) bis auf -2,2 [184].

$$\text{Gl. 3-3:} \quad I = k N d^2 \left[\frac{d}{\lambda} \right]^y$$

Somit ist es nicht überraschend, daß Eichgeraden, die einen weiten Konzentrationsbereich abdecken und damit verschiedene Partikelgrößen durchlaufen, einen sigmoiden Verlauf zeigen [178, 184]. Bei kleinen Partikelgrößen nimmt die Detektorempfindlichkeit in der Region der Mie-Streuung (Auslöschung der Lichtwellen) ebenso ab wie bei sehr großen Partikeln (Reflexion, Refraktion), da sich hier das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen verringert [187].

Zwischen der Peakfläche A und der Masse des Analyten m besteht eine exponentielle Beziehung (Gl. 3-4), die sich durch Logarithmieren linearisieren läßt (Gl. 3-5) und zur quantitativen Auswertung herangezogen wird. Hierin stehen a für den Responsefaktor des Detektors und b für die Steigung [178].

$$\text{Gl. 3-4:} \quad A = a m^b$$

$$\text{Gl. 3-5:} \quad \log A = b \log m + \log a$$

Referenzverbindungen der Oxylipide waren nicht bzw. im Fall von 12-oxo-PDA nur für einen extrem hohen Preis kommerziell erhältlich. Daher wurde, basierend auf der Annahme, daß strukturell verwandte Verbindungen mit nahezu identischem Molekulargewicht sich bei der Bildung der Partikel ähnlich verhalten und somit den gleichen Detektorresponse hervorrufen, die Kalibration des ELSD mit 12-Hydroxy-9Z-octadecensäuremethylester (Ricinolsäuremethylester) und *n*-Heptyljasmonat vorgenommen (vgl. 2.11.3.). Ricinolsäuremethylester besaß mit einer Doppelbindung, Hydroxylgruppe und der gleichen Anzahl an C-Atomen wesentliche Merkmale der geradkettigen Oxylipide, während *n*-Heptyljasmonat die zyklische Struktur von 12-oxo-PDA berücksichtigte. Einem eventuellen Einfluß der sich ändernden Zusammensetzung des Fließmittels (Gradientenelution) auf die Partikelgröße (Gl. 3-1) wurde dadurch Rechnung getragen, daß die Kalibrierstandards jeweils im Bereich der Zielsubstanzen eluierten, wobei 13-HPOT-Me und Ricinolsäure-Me trotz 10 min Unterschied in der Retentionszeit fast identische Eichgeraden ergaben (vgl. 2.11.3.). Auch für verschiedene Mono- bzw. Diacylglyceride wurde jeweils ein ähnlicher Detektorresponse erhalten [189].

Entgegen dem nach Gl. 3-3 erwarteten sigmoiden Verlauf der Eichgerade wurde bei einer Detektorverstärkung von Gain 8, aber nicht bei der empfindlicheren Einstellung Gain 9, eine weitgehend lineare Beziehung zwischen der Konzentration und der Peakfläche erhalten (vgl. Abb. 2-81). Der Linearitätsbereich des ELSD (Gain 8) war mit 10-73 mg L⁻¹ (Ricinolsäure-Me, 13-HPOT-Me) bzw. 20-90 mg L⁻¹ (*n*-Heptyljasmonat) sehr gering, was aber mit anderen Arbeiten übereinstimmte [179, 190, 191].

Zum Verlauf von ELSD-Eichgeraden werden in der Literatur unterschiedliche Aussagen gemacht. Ein linearer Verlauf der Eichgerade wurde bei der Analytik von Epoxy- und Hydroxy-Fettsäuren (10-200 µg) [190] sowie bei Triacylglyceriden (10,6-53 mg mL⁻¹), 1,3-Diacylglyceriden (2,8-14 mg mL⁻¹), 1,2-Diacylglyceriden (3-15 mg mL⁻¹), Monoacylglyceriden (4-21 mg mL⁻¹) und Fettsäuren (7,4-37 mg mL⁻¹) [191] beobachtet. Dagegen berichteten LIU et al. über einen nichtlinearen Detektorresponse für Mono- und Diacylglyceride (12,5-1.250 µg mL⁻¹), der somit eine doppelt logarithmische Auftragung erforderte [189]. Diese voneinander abweichenden Angaben erscheinen jedoch nur auf den ersten Blick widersprüchlich. Tatsächlich weisen Eichgeraden über einen großen Konzentrationsbereich sowohl lineare als auch exponentielle Abschnitte auf, die zusammengenommen einen sigmoiden Verlauf gemäß Gl. 3-3 ergeben [187, 188, 192].

Die Nachweisgrenze betrug 50 ng für Ricinolsäuremethylester bzw. 100 ng für *n*-Heptyljasmonat (vgl. 2.11.3.) und lag damit in der Größenordnung, die für Mono- und Diacylglyceride (60 ng [189]) ermittelt wurde. Für Epoxy- und Hydroxyfettsäuren gaben LIU et al. ein Detektionslimit von 1 µg an [190]. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß in den anderen Arbeiten ein ELSD eines anderen Herstellers (Varex) benutzt wurde und unter Umständen gerätespezifische Unterschiede bestehen, so daß ein Vergleich nur bedingt zulässig ist.

Mit Hilfe der entwickelten HPLC-Analytik wurden in Rohextrakten aus Mungbohnenkeimlingen, die unter verschiedenen Bedingungen mit 13-HPOT inkubiert wurden, nichtflüchtige Metabolite und nicht umgesetztes Substrat quantifiziert (vgl. 2.12.). Parallel dazu wurde die Konzentration von 2*E*-Hexenal gaschromatographisch ermittelt.

Die Untersuchungen zeigten, daß nicht nur die Bildung von 2*E*-Hexenal, sondern auch die der Oxylipide maßgeblich durch die Anwesenheit eines Detergenz beeinflußt wurde (vgl. 2.12.1.). Dies deutete darauf hin, daß die an der Biogenese beteiligten Enzyme in Mungbohnen, wie auch die Hydroperoxid-Lyase, ebenfalls membrangebunden vorkamen. Das Auftreten von 2*E*-Hexenal und der Oxylipide in dem ohne Detergenz hergestellten Rohextrakt wird verständlich, wenn man bedenkt, daß die Zentrifugation bei 6.400 *g* (Entfernung der Pflanzenpartikel) nicht ausreichte, um kleinere Zellbruchstücke vollständig abzutrennen, so daß sich diese noch in dem Rohextrakt befanden und somit für die Produktbildung verantwortlich waren. Allerdings war unter diesen Bedingungen die gesamte katalytische Aktivität in dem Rohextrakt stark eingeschränkt, was daran erkannt werden konnte, daß nach Ablauf der Inkubationszeit noch 38,1 % des Substrates unverändert vorlagen. Zu dessen Umsatz war der erneute Zusatz eines frisch hergestellten Rohextraktes erforderlich, da offensichtlich die Hydroperoxid-Lyase des ersten Rohextraktes inaktiviert war. Interessanterweise wurde so ein höherer 2*E*-Hexenal-Anteil (52,5 %) bei geringerer Oxylipid-Bildung (5,9 %) erzielt als in dem Triton-haltigen Rohextrakt, in dem der Anteil von 2*E*-Hexenal nur 38,3 % und der der Oxylipide 11,8 % betrug. Vielleicht setzten die an den Nebenreaktionen beteiligten Enzyme in solubilisierter Form das Substrat 13-HPOT mit einer höheren Geschwindigkeit um als die Hydroperoxid-Lyase.

Durch Variation weiterer Inkubationsparameter wie Temperatur (vgl. 2.12.2.), Substratkonzentration (vgl. 2.12.3.) und durch einen Zusatz von Ascorbinsäure (vgl. 2.12.4.) wurde versucht, die Umsetzung des Substrates zu 2*E*-Hexenal zu verbessern und den Anteil der Oxylipide möglichst gering zu halten. Dies gelang nach Vergrößerung des

Inkubationsvolumens bei gleichzeitiger Verringerung der Substratkonzentration, woraus die höchste Umsatzrate in dieser Arbeit von 87,4 % resultierte (vgl. 2.12.3.). Diese Versuchsbedingungen waren aber nur schwer mit denen früherer Experimente vergleichbar, da sowohl die Inkubationsdauer, -temperatur, Reaktionsvolumen als auch die Substratmenge von den Standardbedingungen (ca. 50 μmol 13-HPOT, V: 50 mL, t: 1 h, T: RT) abwichen. Festzuhalten bleibt, daß auf diese Weise die Substratkonzentration ungefähr um den Faktor 9,4 erniedrigt wurde. Dieses Ergebnis unterstreicht das bereits diskutierte Phänomen der Inhibierung der Hydroperoxid-Lyase durch das Substrat (vgl. 3.3.3.1.).

Trotz der mit der HPLC-Methodik vorhandenen Möglichkeit, nichtflüchtige Reaktionsprodukte und das instabile Substrat analysieren zu können, konnte der Verbleib von 13-HPOT nicht vollständig aufgeklärt werden. In Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen blieb eine Differenz von ca. 13-50 % bestehen.

Fehler bei der Quantifizierung von 2*E*-Hexenal wurden weitgehend ausgeschlossen, da in Vorversuchen die Wiederfindung von 2*E*-Hexenal in Homogenaten ermittelt wurde, wobei die Inkubation und Extraktion unter identischen Bedingungen wie auch später die der mit 13-HPOT inkubierten Proben erfolgte. Die Wiederfindung von 2*E*-Hexenal lag in der gleichen Größenordnung (ca. 80-90 %) wie die des zur Kontrolle der Extraktion eingesetzten internen Standards Heptansäuremethylester. Dies deutete darauf hin, daß chemische Nebenreaktionen wie z. B. die Bildung von Schiffschén Basen mit pflanzlichen Proteinen oder Aldolkondensation des Aldehyds zumindest keine bedeutende Rolle spielten.

Eine Unsicherheit bei der HPLC-Analytik bestand darin, daß Referenzsubstanzen nicht vorhanden waren und daß daher die Kalibrierung des ELSD mit strukturell verwandten Verbindungen durchgeführt wurde. Wie oben ausgeführt, ist für den Detektorresponse des ELSD die Größe und Anzahl der nach der Evaporation des Lösungsmittels zurückbleibenden Analytpartikel entscheidend. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Oxylipide und der zur Kalibrierung benutzten Verbindungen wurden große Variationen in der Flüchtigkeit der Verbindungen, die möglicherweise den Responsefaktor gravierend beeinflußt hätten, nicht erwartet.

In den durch Flüssig/Flüssig-Extraktion gewonnenen Probelösungen war, mit Ausnahme besonderer Inkubationsbedingungen (vgl. 2.12.), 13-HPOT weder mit dem ELSD noch Diodenarray-Detektor (UV 235 nm) detektierbar, was scheinbar auf einen voll-

ständigen Metabolismus des Substrates hinwies. Im Hinblick auf die Vollständigkeit der Extraktion könnte eine Beobachtung von Bedeutung sein, die wiederholt bei der Isolierung von 13-HPOT gemacht wurde. Zur Erstellung der ELSD-Eichgeraden mußte 13-HPOT aus dem wäßrigen Lipoxygenase-Reaktionsansatz isoliert werden, wobei aufgrund der UV-Reinheit bei 235 nm *n*-Hexan als Lösungsmittel verwendet wurde. Hierbei blieb ein weißlicher Feststoff von zäher Konsistenz im Scheidetrichter zurück, der weder in Diethylether, Ethylacetat oder Ethanol löslich war. Die anschließende photometrische Bestimmung des Gehaltes von 13-HPOT in dem *n*-Hexan-Extrakt ergab, daß im Vergleich zu der ersten photometrischen Bestimmung, die direkt nach Beendigung der Lipoxygenase-Reaktion durchgeführt wurde (vgl. 4.4.1.), nur 70 % von 13-HPOT isoliert wurden. Die Identität dieses Rückstandes wurde wegen der Schwierigkeiten bei dessen Lösung nicht näher untersucht.

Eine Polymerisation von Hydroperoxy-Fettsäuren zu di- oder oligomeren Produkten ist zwar bekannt [193, 194, 195, 196], allerdings findet diese vor allem unter anaeroben Bedingungen statt, wobei die Bildung von Radikalen durch Schwermetallionen oder Metallo-Proteine (z. B. Häm-Proteine) initiiert wird. Die Effektivität der Radikalbildung nimmt hierbei in der Reihenfolge Hämatin, Häm-Proteine > Fe(II) > Fe(III) > Cu(II) ab [162]. Ob bei der Extraktion partiell anaerobe Verhältnisse vorlagen und inwieweit die anwesende Lipoxygenase bei dem von ihrem Optimum stark abweichenden pH-Wert (pH 4,0) die Radikalbildung aus 13-HPOT förderte (vgl. auch Abb. 3-2), konnte nicht abschließend geklärt werden. In den aus Mungbohnenkeimlingen hergestellten Rohextrakten war das Auftreten eines solchen Rückstandes wegen der schlechten Phasentrennung (starke Schleimbildung) zwar nicht zu beobachten, aber auch nicht auszuschließen.

Die Bildung von weiteren Nebenprodukten, die mit dem relativ unpolaren Lösungsmittelgemisch Pentan/Diethylether (1:1,12, v/v) nicht extrahiert wurden, war theoretisch vorstellbar. Hydroperoxide können beispielsweise an Proteine, die ja auch in den Homogenaten und Rohextrakten enthalten waren, gebunden werden, wobei zwischen nicht-kovalenten Komplexen und kovalenten Reaktionsprodukten differenziert wird [161, 197, 198, 199]. Im ersten Fall beruht die Bindung des Hydroperoxids an das Protein auf hydrophoben Wechselwirkungen oder auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Während bei der hydrophoben Bindung das Hydroperoxid nur sehr schwach gebunden wird, ist zur Extraktion des über Wasserstoffbrücken gebundenen Hydroperoxids ein Lösungsmittel (z. B. Trichlormethan/Methanol 2:1) erforderlich, das in der Lage ist, diese Wasserstoffbrücken aufzubrechen [161]. Vermutlich können in gleicher

Weise auch die Oxylipide an Proteine gebunden werden. In Vorversuchen zur Oxylipid-Analytik wurde jedoch nach einem Wechsel des Lösungsmittels (Diethylether, Dichlormethan, Ethylacetat) zumindest gaschromatographisch kein Unterschied zu Pentan/Diethylether festgestellt. Die Analytik mittels HPLC war zu dem damaligen Zeitpunkt noch nicht möglich.

Sind hingegen Radikalinitiatoren wie Metallo-Proteine oder Schwermetalle zugegen, so kann die Bindung des Hydroperoxids an das Protein kovalent erfolgen. Es muß jedoch einschränkend angemerkt werden, daß dies hauptsächlich unter anaeroben Bedingungen eintritt, während in Gegenwart von Sauerstoff aus den Peroxy- oder Alkoxyradikalen vor allem Verbindungen mit höherer Oxyfunktionalität hervorgehen [161].

3.4.3. Biogenese und pflanzenphysiologische Aufgaben der Oxylipide

Mit Hilfe der HPLC-Particle Beam-Massenspektrometrie (PB-MS) und der GC-MS-Analytik wurden zahlreiche Nebenprodukte identifiziert, die enzymatisch, aber auch durch Hydrolyse enzymatisch gebildeter Intermediate, im Verlauf des Lipoxygenase-Weges generiert wurden. Das in Abb. 3-12 gezeigte Schema stellt eine Erweiterung des bereits in der Einleitung beschriebenen Biogenese-Weges um mehrere Enzymreaktionen dar. Vielfach wird die Gesamtheit der Hydroperoxid-metabolisierenden Enzyme auch als Oxylipid-Weg bezeichnet, was nicht nur die einleitende Lipoxygenase-Reaktion berücksichtigt, sondern den Schwerpunkt stärker auf die Vielfalt der Produkte (Oxylipide) legt. In dem Oxylipid-Weg kommen den Hydroperoxy-Fettsäuren (13-HPOT, 13-HPOD) als Schlüsselintermediaten eine zentrale Bedeutung zu, da sie nicht nur als Substrate für die Hydroperoxid-Lyasen dienen, sondern auch von weiteren Enzymen wie Allenoxid-Synthasen und Peroxygenasen metabolisiert werden.

Aufgrund der Bildung von Ketolen während der Inkubation mit 13-HPOT wurde auf die Anwesenheit einer Allenoxid-Synthase in Mungbohnen geschlossen. Allenoxid-Synthasen (AOS) sind Cytochrom P450 Enzyme [200, 201, 202], die 13(*S*)-Hydroperoxide der Linol- [203] oder Linolensäure [204] zu Allenoxiden transformieren. Diese extrem instabilen Metabolite besitzen bei 0 °C eine chemische Halbwertszeit von nur 15-33 s [203, 204] und hydrolysieren in wäßrigen Systemen spontan zu Ketolen und Cyclopentenon-Fettsäuren. Die Hydrolyse des aus 13-HPOT abgeleiteten Allenoxids 12,13-Epoxy-9*Z*,11,15*Z*-octadecatriensäure (12,13-EOT) führt somit zur Bildung der 12,13- α -, 9,12- γ -, 11,12- α -Ketole (Abb. 3-13) und racemischer *cis*-12-Oxo-phytodien-säure (Abb. 3-14) [40, 204].

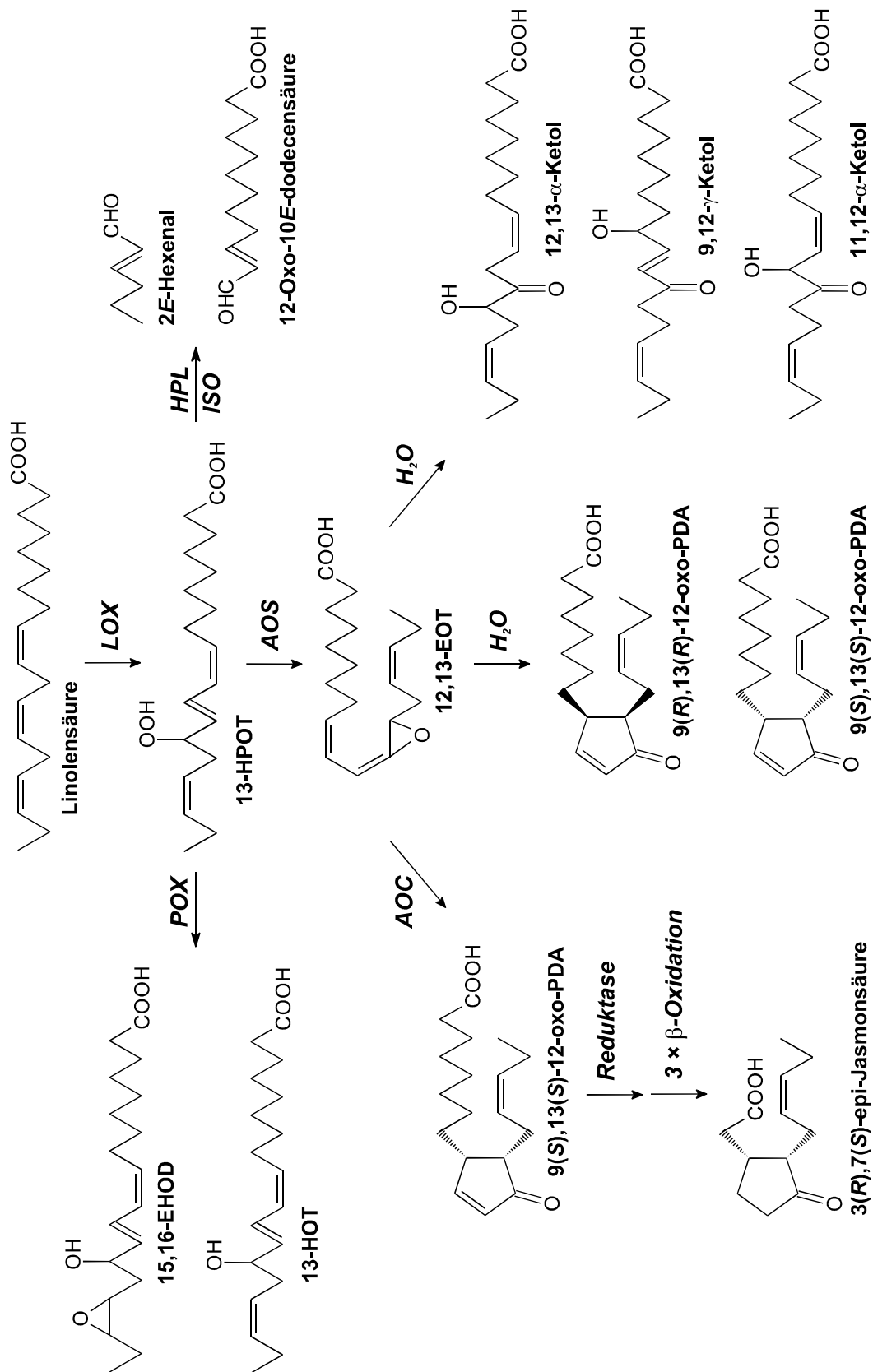


Abb. 3-12: Der Oxylipid-Weg. LOX: Lipoxygenase, HPL: Hydroperoxid-Lyase, ISO: Isomerase, POX: Peroxygenase, AOS: Allenoxid-Synthase, AOC: Allenoxid-Cyclase.

In Abhängigkeit vom pH-Wert kann die Öffnung des Oxiranringes entweder durch einen nucleophilen Angriff eines Hydroxid-Ions am C₁₃ von 12,13-EOT oder durch Protonierung des Oxiransauerstoffs initiiert werden [40]. Da in der vorliegenden Arbeit die Inkubation bei pH 6,5 durchgeführt wurde, wird nur letzteres schematisch dargestellt (Abb. 3-13). Die protonierte Oxirangruppe wird vom Wasser am C₁₃ nucleophil angegriffen. Nach Verlust eines Protons geht das 2-En-1,2-diol in die bevorzugte Keto-Form über und ergibt somit das 12,13- α -Ketol.

Wird dagegen das Wasser wieder abgespalten, so führt die Delokalisierung der positiven Ladung des Carbokations über die Δ^9 - und Δ^{11} -Doppelbindung zu zwei weiteren mesomeren Grenzstrukturen, an die nachfolgend Wasser angelagert wird. Keto-Enol-Tautomerie hat schließlich die Bildung des 11,12- α - bzw. des 9,12- γ -Ketols zur Folge.

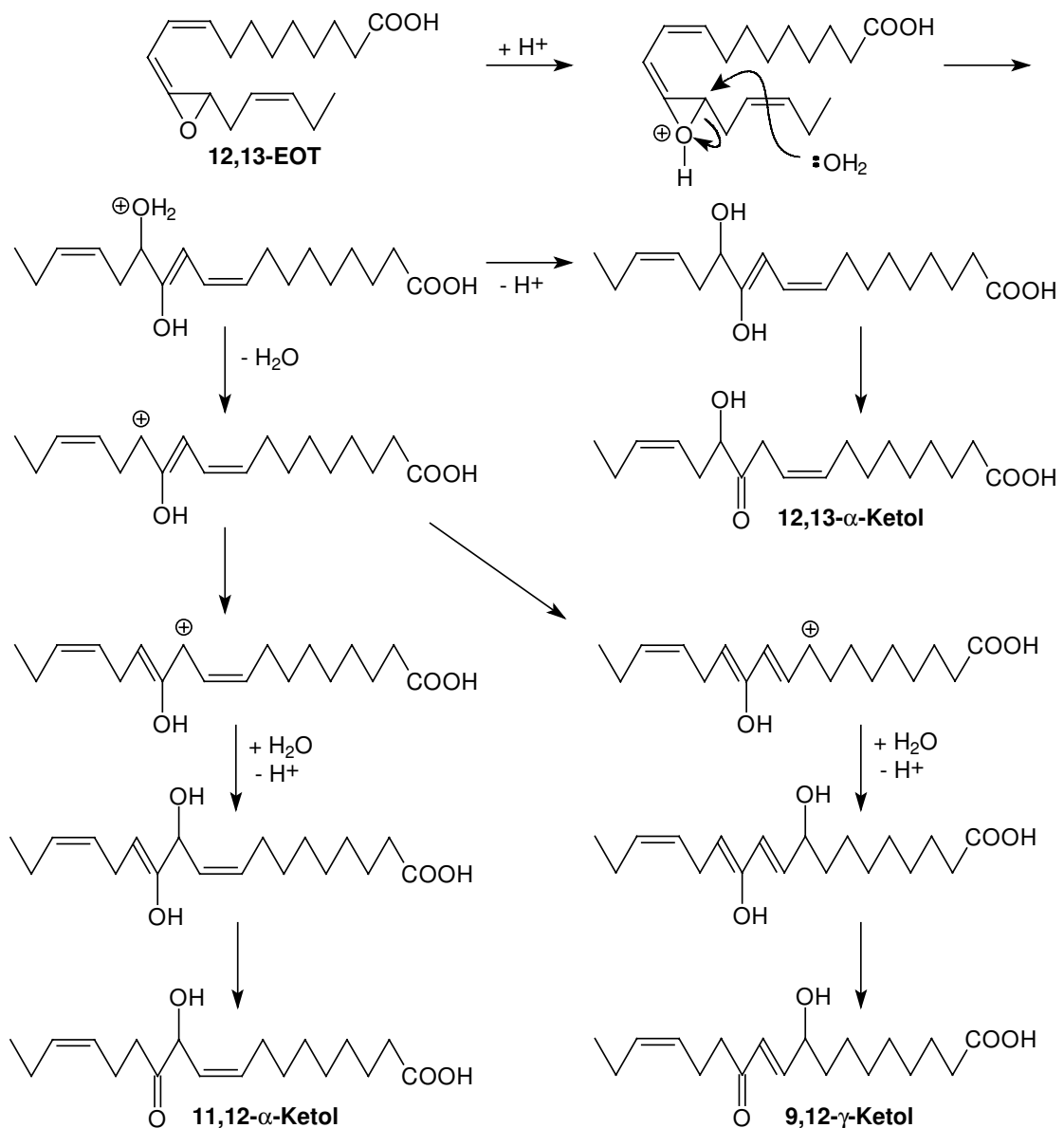


Abb. 3-13: Hydrolyse des Allenoxids 12,13-EOT.

Die Zyklisierung des Allenoxids 12,13-EOT zu 12-oxo-PDA kann sowohl chemisch [205] als auch enzymatisch durch Allenoxid-Cyclasen stattfinden [172, 206, 207, 208]. Beide Reaktionen können durch die optische Reinheit der gebildeten Produkte voneinander unterschieden werden.

Obwohl die Geometrie der Δ^{11} -Doppelbindung in dem Allenoxid bislang nicht aufgeklärt ist, erscheint im Hinblick auf die Zyklisierung die *cis*-Konfiguration wahrscheinlicher [204]. Bei der chemischen Zyklisierung (Abb. 3-14) von 12,13-EOT wird ein Zwitterion, das durch spontane Öffnung (self-opening) der Oxirangruppe entsteht, als Intermediat angesehen [205, 209]. Nach den Regeln von Woodward-Hoffmann erfolgt der pericyclische Ringschluß konrotatorisch, was zu racemischer 12-oxo-PDA mit *cis*-orientierten Seitenketten führt.

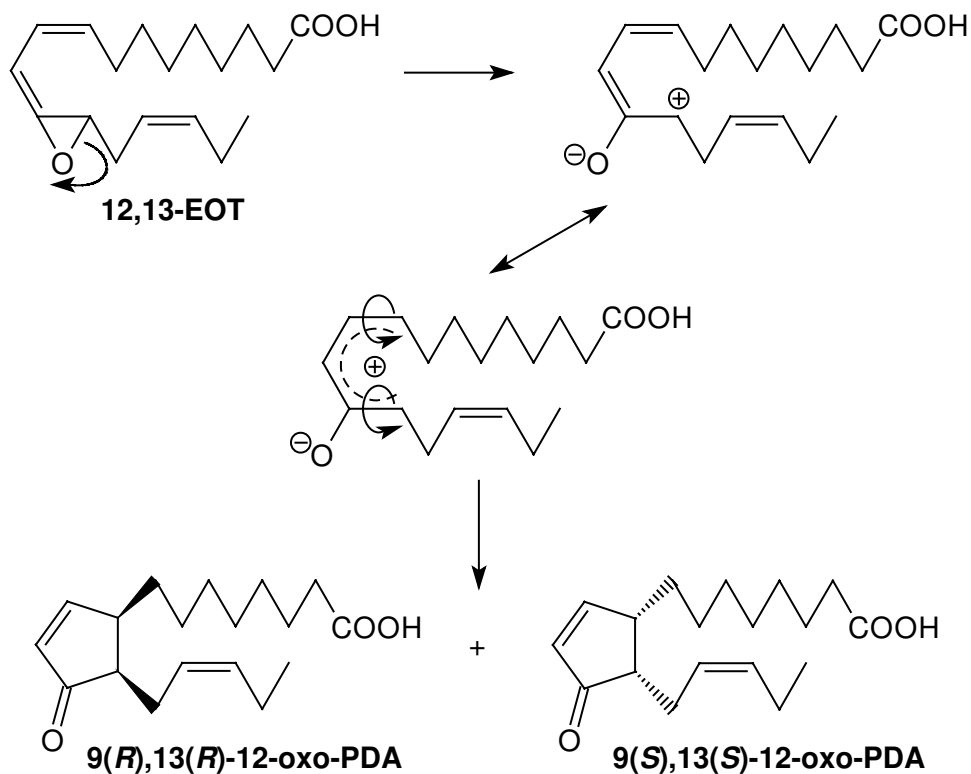


Abb. 3-14: Zyklisierung des Allenoxids 12,13-EOT zu racemischer 12-oxo-PDA.

Dagegen findet die von Allenoxid-Cyclasen (AOC) katalysierte Zyklisierung mit hoher Stereospezifität statt und liefert nur das 9(S),13(S)-Enantiomer von 12-oxo-PDA [206, 210]. Das zu 12,13-EOT analoge Allenoxid 12,13-Epoxy-9Z,11-octadecadiensäure (12,13-EOD) fungiert nicht als Substrat für das Enzym, was zeigt, daß die Δ^{15} -Doppelbindung für die Zyklisierung offensichtlich ein essentielles Strukturmerkmal darstellt [210].

Da jedoch das Enantiomerenverhältnis von 12-oxo-PDA nicht näher untersucht wurde, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Zyklisierung unter Beteiligung einer Allenoxid-Cyclase oder chemisch erfolgte.

Das Auftreten von 15,16-Epoxy-13-hydroxy-9Z,11E-octadecadiensäure (15,16-EHOD) und 13-Hydroxy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure (13-HOT) kann auf eine in Mungbohnen vorkommende Peroxygenase zurückgeführt werden. Peroxygenasen, membran-gebundene Häm-Proteine, katalysieren unter anderem [211, 212, 213] die Hydroperoxid abhängige Epoxidierung von ungesättigten Fettsäuren [35, 214]. Nach heterolytischer Spaltung der Hydroperoxidgruppe wird der terminale Sauerstoff intermolekular und/oder intramolekular auf ein geeignetes Akzeptormolekül übertragen (Abb. 3-15) [35].

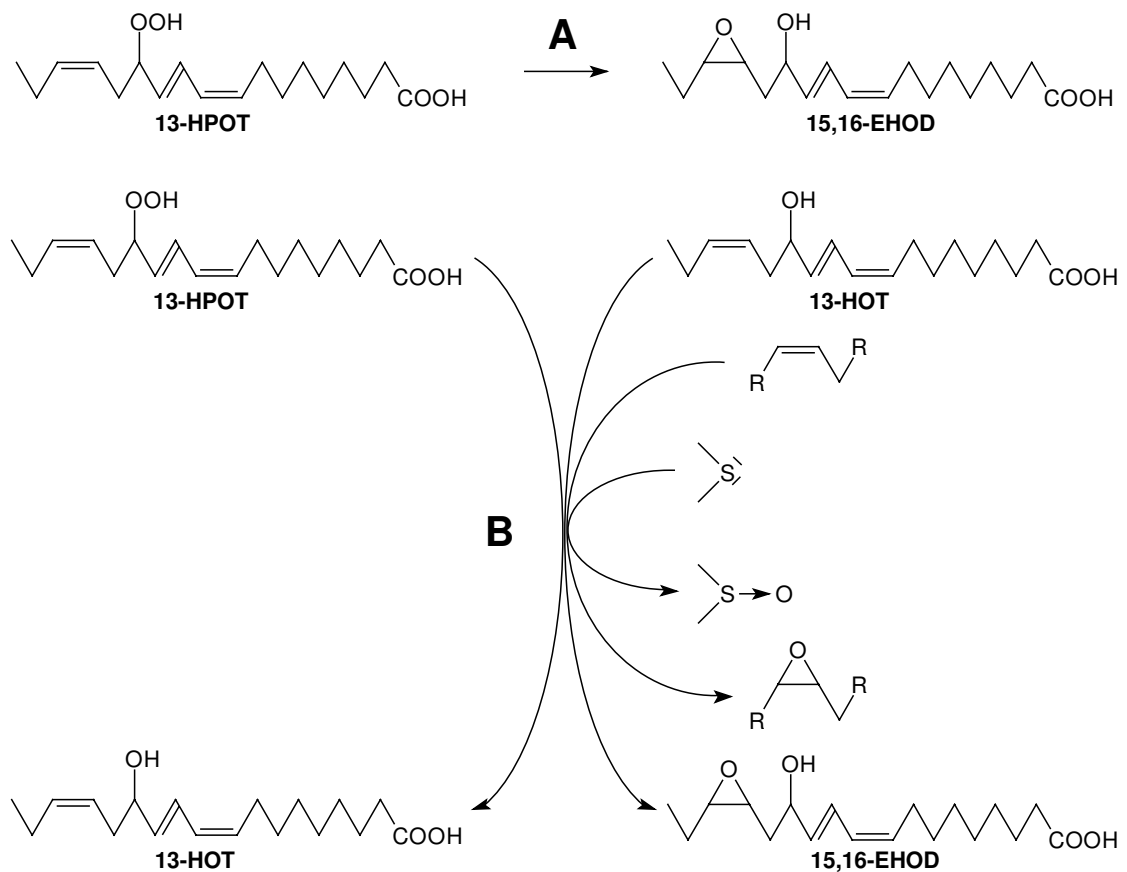


Abb. 3-15: Intramolekularer (A) und intermolekularer (B) Reaktionsmechanismus der Peroxygenase (modifiziert nach [35]).

Während der intramolekulare Mechanismus nur zu der Bildung der Epoxy-Hydroxy-Fettsäure führt, sind die Produkte der intermolekularen Reaktion unter Umständen vielfältiger. Hier diffundiert 13-HOT vor dem Transfer des Sauerstoff zur Δ^{15} -Doppelbindung aus dem aktiven Zentrum hinaus und kann durch andere Akzeptormoleküle

ersetzt werden. Allerdings ist in Abwesenheit solcher konkurrierenden Verbindungen auch eine erneute Bindung von 13-HOT möglich, die wiederum 15,16-EHOD ergibt. Basierend auf Isotopenexperimenten wurde in Sojabohnen ein Verhältnis von intra- zu intermolekularer Reaktion von 3:1 ermittelt [35]. Neben Sojabohnen [35, 85] wurden Epoxy-Hydroxy- und Hydroxy-Fettsäuren auch in Saubohnen (*Vicia faba* L.) [215] und in verschiedenen Getreidesorten [214] detektiert.

Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß 13-HOT daneben auch auf chemischen Weg aus 13-HPOT gebildet werden kann. So war die Konzentration von 13-HOT in Gegenwart von 10-25 mM Ascorbinsäure, einem starken Reduktionsmittel, ungefähr um den Faktor 3 höher als in einer Vergleichsprobe (vgl. 2.12.4.).

Die enzymatische Bildung der Ketole und von 12-oxo-PDA aus 13-HPOT ist seit Jahrzehnten bekannt. In Unkenntnis darüber, daß intermediär ein Allenoxid auftritt, wurden diese Reaktionen ursprünglich einer sogenannten „Hydroperoxid-Isomerase“ (Ketole) [32, 37, 216, 217, 218] bzw. einer „Hydroperoxid-Cyclase“ (12-oxo-PDA) [31, 219, 220, 221] zugeschrieben.

Über die physiologische Bedeutung herrschte jedoch lange Unklarheit, bis ein metabolischer Zusammenhang zwischen Jasmonsäure und 12-oxo-PDA festgestellt wurde [222, 223]. Die Biosynthese von Jasmonsäure, einem Phytohormon, die ausgehend von 12-oxo-PDA eine Reduktion der Doppelbindung des Cyclopentenon-Ringes [224] und eine Verkürzung der Alkyl-Seitenkette um 6 C-Atome beinhaltet (Abb. 3-12) [225], kann neben der Synthese der ebenfalls physiologisch aktiven C₆- und C₉-Verbindungen (vgl. 3.1.1.) als eine der bedeutendsten Funktionen des Oxylipid-Weges angesehen werden [38].

In zahlreichen Übersichtsartikeln wurden die immensen physiologischen Aufgaben von Jasmonsäure und deren Methylester detailliert zusammengefaßt [3, 38, 226, 227, 228, 229]. Als Beispiele sollen hier nur einige Funktionen wie die Regulation des Wachstums, Beeinflussung der Entwicklung von Frucht und Blüten, Chlorophyllabbau, Induktion sogenannter Jasmonat-induzierter Proteine (Jasmonate-induced proteins, JIP), zu denen u. a. die an der Bildung von Sekundärmetaboliten beteiligten Enzyme Phenylalanin-Ammonium-Lyase, Chalcon-Synthetase und Polyphenol-Oxidase [230, 231] zählen, sowie die Induktion von Speicherproteinen (Vegetative storage proteins, VSP) [232] angeführt werden. Vor allem die Induktion von Proteinase-Inhibitoren [233, 234] und Lipoxygenase [235] sowie Stimulation der Hydroperoxid-Lyase-Aktivität [236] zeigt,

daß ein wichtiger Aufgabenbereich in der Pflanzenabwehr liegt. In dieser Arbeit konnte unter den verwendeten Inkubationsbedingungen jedoch keine Jasmonsäure nachgewiesen werden.

Nicht nur Jasmonsäure, sondern auch 12-oxo-PDA übt in Pflanzen eine bioaktive Wirkung aus. FARMER und RYAN zeigten, daß von den octadecanoiden Vorstufen der Jasmonsäure (Linolensäure, 13-HPOT, 12-oxo-PDA) alle die Bildung von Proteinase-Inhibitoren induzierten, nachdem sie auf die Oberfläche von Tomatenblättern aufgetragen worden waren [233]. Hierbei wirkte 12-oxo-PDA am stärksten induzierend, wobei sogar die nach Verletzung des Pflanzengewebes (Wound-Response) gebildete Inhibitor-Konzentration übertroffen wurde. Im Vergleich zu Jasmonsäure wurde fast deren bioaktives Potential erreicht. Hinsichtlich der Induktion von Sekundärmetaboliten verfügte 12-oxo-PDA über eine gleichwertige oder sogar stärkere Bioaktivität als *7-epi*-Jasmonsäure [237, 238], so daß vorgeschlagen wurde, daß es sich bei 12-oxo-PDA um den primären Signalüberträger handele, während Jasmonsäure nur noch ein bioaktiver Metabolit sei [225, 239].

Unklar ist hingegen die physiologische Bedeutung der Ketole und der anderen oxyfunktionalisierten Fettsäuren (13-HOT, 15,16-EHOD). Aufgrund der fungiziden Wirkung, die bei Trihydroxy-, Hydroxy- und Epoxy-Fettsäuren festgestellt wurde [240, 241, 242, 243], kann ebenfalls eine Beteiligung der identifizierten Oxylipide an der Abwehr von Pathogenen vermutet werden. Die Produkte der Peroxygenase-Katalyse tragen als Monomere oder deren Vorstufen zur Bildung von Cutin bei, das die äußere Barriere der Pflanze darstellt [244].

3.5. Ausblick

In dieser Arbeit wurden durch die Spaltung von 13-Hydroperoxy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure (13-HPOT) mit einer Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen sehr hohe Gehalte an 2E-Hexenal (max. 1,07 g kg⁻¹) erzielt, die teilweise bedeutend über denen anderer biotechnologischer Verfahren lagen. Eine weitere Steigerung der Ausbeute erscheint mit dem beschriebenen System jedoch fraglich, da die Hydroperoxid-Lyase bei Verwendung hoher Substratkonzentrationen irreversibel inhibiert wurde.

Daher sollte die Aufmerksamkeit vor allem auf die Aufklärung des bislang noch nicht in allen Einzelheiten bekannten Mechanismus der Hydroperoxidspaltung sowie auf die Art

und Weise der Enzyminhibierung gerichtet werden. Dazu wären gezielte proteinchemische Untersuchungen notwendig, um mögliche Modifikationen einzelner Aminosäuren oder des Häm *b* im aktiven Zentrum nachzuweisen. Die Anwendung der Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie könnte bei der Detektion von freien Radikalen, die u. U. während der Katalyse intermediär auftreten, hilfreich sein.

Die Kenntnis der Regulierung der Enzymaktivität der aus mehreren Untereinheiten bestehenden Hydroperoxid-Lyase *in vivo* könnte ein Schlüssel zum Verständnis der Inhibierung werden. So ist zu vermuten, daß eine schlagartige Bildung des α,β -ungesättigten Aldehyds 2*E*-Hexenal im Übermaß nicht nur den Verursacher (Insekten, Mikroorganismen) der pflanzlichen Gewebeverletzung, sondern infolge dessen Reaktivität [245] auch die Pflanze selbst schädigen würde. In diesem Zusammenhang kommt möglicherweise der Hydroperoxidkonzentration eine wichtige Rolle zu, da eine Verminderung der Enzymaktivierung bei sehr geringen Substratkonzentrationen festgestellt wurde (vgl. 2.9.3.1.). Daher sollte auf jeden Fall untersucht werden, ob diese Inaktivierung vielleicht erst oberhalb einer bestimmten Grenzkonzentration von 13-HPOT eintritt.

Prinzipiell wurde mit der erfolgreichen Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnen die Möglichkeit eines wiederholten Einsatzes geschaffen. In Verbindung mit der Immobilisierung einer Lipase sowie Lipoxygenase könnte auf diese Weise ein enzymtechnischer Prozeß zur Gewinnung natürlicher Grünnoten etabliert werden. Mit der immobilisierten Hydroperoxid-Lyase wurde jedoch nicht die Produktivität der Homogenate oder Rohextrakte erreicht, was einer rentablen Nutzung der Immobilisate, auch in Anbetracht der Inaktivierung, bisher noch im Wege steht. Im Hinblick auf weitere Inhibierungsstudien sind die Immobilisate jedoch sehr gut geeignet, den Einfluß von protektiven Verbindungen oder von anderen Parametern auf die Enzymstabilität zu ermitteln.

Während zahlreiche Erkenntnisse zu den physiologischen Funktionen der 13-HPOT-Metabolite 2*E*-Hexenal, 12-Oxo-10*E*-dodecensäure und 12-Oxo-phytodiensäure vorliegen, ist die Bedeutung der anderen Oxylipide, vor allem die der Ketole, bislang Gegenstand von Vermutungen. Hier könnte beispielsweise das mögliche bioaktive Potential dieser Verbindungen in Bioassays gegenüber (phytopathogenen) Mikroorganismen näher untersucht werden.

Als Nebenprodukte wurden zahlreiche nichtflüchtige Oxylipide mittels hochleistungsflüssigchromatographischer und gaschromatographischer Analysenverfahren identifiziert. Dennoch konnte der Metabolismus von 13-HPOT nicht restlos aufgeklärt werden. Zur Vervollständigung der Substratbilanz sollten auch Produkte ins Auge gefaßt werden, die eventuell durch Flüssig/Flüssig-Extraktion nicht extrahierbar waren. Auf die Möglichkeit der Bindung von 13-HPOT an Proteine oder Polymerisation wurde bereits hingewiesen (vgl. 3.4.2.). Der Einsatz von [¹⁴C]-markiertem 13-HPOT sowie die gelchromatographische und hochleistungsflüssigchromatographische Untersuchung der wäßrigen Phase könnten einen genaueren Einblick in die vielfältigen Wege des 13-HPOT-Metabolismus in Pflanzen verschaffen.

4. Experimenteller Teil

4.1. Materialien und Chemikalien

4.1.1. Pflanzen

Die Saaten von Mungbohnen und Luzerne wurden über den örtlichen Handel bezogen.

Mungbohnen: Natco Mung Beans
 Importeur: T. Choithram and Sons Ltd., Choithram House,
 Lancelot Road, Wembley, Middlesex

Luzerne: abgepackt im Gartenfachgeschäft

Außerdem wurden Luzernepflanzen (Alter: unbekannt, Höhe: 50-60 cm) in Bierbergen von einem Feld geerntet.

4.1.2. Lösungsmittel

Hochschullieferungen (Faßware) wurden vor Gebrauch an Füllkörperkolonnen destilliert. Pentan/Diethylether (1:1,12, v/v, Azeotrop) wurde aus den in Tab. 4-1 aufgeführten Lösungsmitteln gemischt.

Tab. 4-1: Verwendete Lösungsmittel.

Lösungsmittel	Reinheit	Lieferant
Dichlormethan	dest.	Hochschullieferung
Diethylether	dest.	Hochschullieferung
Essigsäureethylester	> 99,5 %	Fluka
<i>n</i> -Hexan	HPLC	Roth
Isopropanol	HPLC	Fluka
Methanol	HPLC	Baker
Pentan	dest.	Hochschullieferung

4.1.3. Chemikalien

Chemikalien, die nur in Einzelfällen benutzt wurden, werden in den folgenden Kapiteln bei ihrer Verwendung spezifiziert.

Tab. 4-2: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Reinheit	Lieferant
Ascorbinsäure	99,7 %	Riedel-de Haen
Borsäure	99,5 %	Fluka
<i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol		Fluka
Citronensäure	99,5 %	Fluka
Cystein		Merck
2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxytoluol		Roth
Dithiothreitol	Research grade	Serva
Eisessig	99,5	Fluka
Glutathion, reduzierte Form	98 %	Aldrich
HCl, konz.		
Heptansäuremethylester	99 %	Sigma
Hexanal	98 %	Fluka
2 <i>E</i> -Hexenal	98 %	Aldrich
K ₂ HPO ₄	99 %	Fluka
NaBH ₄	97 %	Fluka
NaCl	99,5 %	Riedel-de Haen
NaH ₂ PO ₄	99 %	Fluka
NaOH	98 %	Fluka
NaN ₃		Merck
Na ₂ SO ₄ , wasserfrei	99 %	Riedel-de Haen
Nonansäuremethylester	99 %	Sigma
Nordihydroguajaretsäure	95 %	Fluka
Phenylmethansulfonylfluorid	99 %	Fluka
Ricinolsäuremethylester	99 %	Sigma
Sorbitol	99,5 %	Fluka
Tris	99,8 %	Pharmacia Biotech
Triton X-100	Sigma Ultra	Sigma
Triton X-100R		Aldrich
Triton X-100R-PC		Sigma

4.1.4. Enzyme

Tab. 4-3: Verwendete Enzyme.

Enzym	Spezifikationen	Hersteller
Lipoxygenase (Soja)	Typ 1-B, Protein: ca. 60 %, Aktivität: 110.600 U mg ⁻¹ Feststoff ^a	Sigma
Lipase (<i>Candida rugosa</i>)	Typ VII, Aktivität: 943 U mg ⁻¹ Feststoff ^b	Sigma

^a: 1 Unit verursacht einen Anstieg der Extinktion bei 234 nm von 0,001 pro min (pH: 9,0, T: 25 °C, Küvettenvolumen: 3 mL, Küvette: 1 cm Schichtdicke, Substrat: Linolsäure).

^b: 1 Unit hydrolysiert 1,0 Mikroequivalent Fettsäure aus Olivenöl in 1 h (pH: 7,2, T: 37 °C, Inkubation: 30 min).

4.1.5. Gele für die Immobilisierung

Tab. 4-4: Verwendete Gele.

Gel	Spezifikationen	Hersteller
Affi-Gel 10	quervernetztes Agarose-Gel, reaktive Gruppe: N-Hydroxylsuccinimid-Ester, Partikel: 75-300 µm, Funktionalität: 15 µmol mL ⁻¹ Gel, Kapazität: 35 mg mL ⁻¹	Bio-Rad
Affi-Gel 15	quervernetztes Agarose-Gel, reaktive Gruppe: N-Hydroxylsuccinimid-Ester, Partikel: 75-300 µm, Funktionalität: 15 µmol mL ⁻¹ Gel, Kapazität: 35 mg mL ⁻¹ Gel	Bio-Rad
UltraLink Iodoacetyl	quervernetztes Bisacrylamid/Azlacton Copolymer, reaktive Gruppe: Iodacetyl, Partikel: 50-80 µm	Pierce
UltraLink Biosupport Medium	quervernetztes Bisacrylamid/Azlacton Copolymer, reaktive Gruppe: Azlacton, Partikel: 50-80 µm, Funktionalität: 31,25 µmol mL ⁻¹ Gel, Kapazität: 15 mg mL ⁻¹ Gel (BSA)	Pierce

4.1.6. Gase

Die Luft wurde durch einen Staubfilter der Außenluft entnommen und durch einen ölfrei arbeitenden Membrankompressor komprimiert. Die Trocknung erfolgte an einem Wasserabscheider und an einer 30 × 5 cm Silicagelsäule.

Tab. 4-5: Verwendete Gase.

Gas	Verwendung	Reinheit	Lieferant
Helium	Trägergas (GC-MS), Vernebelung des HPLC-Eluenten (PB-MS)	5.0	Linde
Luft	Detektorgas (GC), Vernebelung des HPLC-Eluenten (ELSD)	getrocknet	Kompressor
Sauerstoff	Lipoxygenase-Reaktion	3.5	Linde
Stickstoff	Spülgas (GC), Methylierung	5.0	Linde
Wasserstoff	Träger- und Detektorgas (GC)	5.0	Linde

4.1.7. Geräte

Tab. 4-6: Verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Haushaltsmixer	Typ 240	Krups
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134	Büchi
Tischschüttler	KL 2	Bühler
Tischzentrifuge	Piccolo	Martin Christ
Ultraschallbad	Sonorex RK 100	Bandelin
Ultraturrax	Typ TP 18/2	Janke & Kunkel
Vakuumpumpe	Modell RV 3	Edwards
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus Sepatech

4.2. Analytik

4.2.1. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC-System 1

Anwendung:	Reinheitskontrolle der Fettsäurehydroperoxide
Pumpe:	Programmierbare HPLC-Pumpe PU-980 mit ternärer Gradienteneinheit LG-980-02 (Jasco)
Degasser:	3-Kanal Degasser DG-980-50 (Jasco)
Detektor:	Pye Unicam UV-Detektor PU 4020 (Philips) Wellenlänge: 235 nm
Integrator:	Chromatopac C-R6A (Shimadzu)
Injektionsventil:	Rheodyne-Ventil mit 20 µL Probenschleife
Säule:	Nucleosil 100-5, 200 × 4 mm, 5 µm (Macherey & Nagel)
Flußrate:	1 mL min ⁻¹
Fließmittel:	<i>n</i> -Hexan / Isopropanol / Eisessig (98,9 : 1 : 0,1, v/v/v)

HPLC-System 2

Anwendung:	Analytik der Oxylipide
Pumpe:	Programmierbare HPLC-Pumpe PU-980 mit ternärer Gradienteneinheit LG-980-02 (Jasco)
Degasser:	3-Kanal Degasser DG-980-50 (Jasco)
Detektor 1:	UV/VIS-Photodiodenarray-Detektor MD-910 (Jasco)
Detektor 2:	Lichtstreu-Detektor (ELSD) Sedex 55 (Sedere), T: 40 °C, p: 2,0 bar, Gain: 8, Nebulizer-Gas: Luft Die Detektoren 1 und 2 waren seriell angeordnet.
Datenauswertung:	Borwin Chromatographie-Software (Version 1.20)
Injektionsventil:	Rheodyne-Ventil mit 20 µL Probenschleife
Säule:	LiChrospher 100 Diol, 250 × 4 mm, 5 µm (Merck)
Flußrate:	0,4 mL min ⁻¹
Fließmittel:	A: <i>n</i> -Hexan / Isopropanol (98 : 2, v/v) B: Isopropanol
Gradient:	0-10 min: 100 % A 10-35 min: linearer Anstieg auf 15 % B 35-36 min: linearer Anstieg auf 50 % B, 20 min halten (Spülschritt)

HPLC-System 3

Das chromatographische System (HPLC-Anlage, Säule, Fließmittel) war mit Ausnahme der Detektion identisch mit HPLC-System 2.

Anwendung:	Identifizierung der Oxylipide
LC-MS Interface:	Particle Beam Interface 59980B (Hewlett Packard) Nebulizer-Gas: Helium, Einlaß-Druck: 415 kPa, Desolvation chamber: T: 60 °C
Detektion:	Massenspektrometer 5989A (Hewlett Packard) Ionenquelle: T: 250 °C, Quadrupol: T: 100 °C, Ionisierungsenergie: 70 eV (EI-Modus) bzw. 100 eV (CI-Modus, Reaktant-Gas: Methan)
Massenbereich:	88-600 (m/z)
Datenauswertung:	HP-UX Chem Station und B06.01 Software (Hewlett Packard), Wiley Massenspektren Datenbank

4.2.2. Gaschromatographie (GC)**GC-System 1**

Anwendung:	Analytik von Aromastoffen, Fettsäure-Verteilung
Gaschromatograph:	GC 8180 (Fisons)
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), T: 270 °C
Injektor:	On-Column Injektor, 1 µL Injektionsvolumen
Säule:	Sato Wax Fused Silica Kapillarsäule, 30 m × 0,32 mm × 0,4 µm (Sato)
Trägergas:	Wasserstoff: Fluß: 3 mL min ⁻¹ , Vordruck: 40 kPa
Brenngase:	Wasserstoff: 50 kPa Luft: 100 kPa
Temp.-Programm:	40 °C (2 min), mit 4 °C min ⁻¹ auf 220 °C (10 min)
Auswertung:	Chrom-Card for Windows, Version 1.19 (CE Instruments)

GC-System 2

Anwendung:	Identifizierung von Aromastoffen
Gaschromatograph:	Gaschromatograph 8000 Series (8060) (Fisons)
Detektor:	Massenselektiver Detektor MD 800 (Fisons) Ionenquelle: T: 200 °C, Quadrupol: T: 100 °C, Ionisierungsenergie: 70 eV (EI-Modus)
Massenbereich:	33-300 (m/z)
Injektor:	On-Column Injektor, 1 µL Injektionsvolumen
Säule:	BC CW 20 M Fused Silica Kapillarsäule, 25 m × 0,32 mm × 0,25 µm (Leupold, Weihenstephan)
Trägergas:	Helium, 50 kPa
Temp.-Programm:	40 °C (2 min), mit 4 °C min ⁻¹ auf 220 °C (10 min)
Datenauswertung:	Mass Lab Version 1.3 mit NIST Massenspektren Datenbank

GC-System 3

Anwendung:	Identifizierung der Oxylipide
Gaschromatograph:	HP 5890 Series II (Hewlett Packard)
Detektor:	Massenspektrometer HP 5989A (Hewlett Packard) Ionenquelle: T: 250 °C, Quadrupol: T: 100 °C, Ionisierungsenergie: 70 eV (EI-Modus)
Massenbereich:	silylierte Proben: 33-600 (m/z) methylierte Proben: 33-450 (m/z)
Injektor:	On-Column Injektor, 1 µL Injektionsvolumen
Säule:	BC SE-54 Fused Silica Kapillarsäule, 25 m × 0,32 mm × 0,4 µm (Leupold, Weihenstephan)
Trägergas:	Helium, 50 kPa
Temp.-Programm:	<i>Derivatisierung 1 (Me-Ester):</i> 40 °C (2 min), mit 3,5 °C min ⁻¹ auf 270 °C (20 min) <i>Derivatisierung 2 (Me-Ester, O-Methyloxim, TMS):</i> 60 °C (2 min), mit 4 °C min ⁻¹ auf 270 °C (20 min)
Datenauswertung:	HP-UX Chem Station und B06.01 Software (Hewlett Packard), Wiley Massenspektren Datenbank

GC-System 4

Anwendung:	Mikropräparative Gaschromatographie: Isolierung von 12-Oxo-10E-dodecensäuremethylester
Gaschromatograph:	MCS Gerstel Series II (Gerstel)
Injektion:	Autosampler 7673 (Hewlett Packard), Injektionsvolumen: insgesamt 12 μL pro GC-Lauf ($3 \times 4 \mu\text{L}$) Kaltaufgabesystem KAS-3 (Gerstel), Temperaturen: 40 °C (20 s), mit 10 °C s^{-1} auf 230 °C (120 s)
Detektoren:	2 Flammenionisationsdetektoren, T: 250 °C
Säulen:	1. Säule: OV 1, 3 m \times 0,53 mm \times 2 μm (Leupold, Weihenstephan) 2. Säule: BC CW 20 M, 25 m \times 0,53 mm \times 1 μm (Leupold, Weihenstephan)
Säulenschaltung:	Transfer vom KAS zu der 1. Säule: 20-65 s nach der Injektion, von der 1. zur 2. Säule: 29-31 min, von der 2. Säule zum Fraktionensammler: 35,62-36,75 min
Temp.-Programm:	60 °C (4 min), mit 4 °C min^{-1} auf 188 °C, mit 5 °C min^{-1} auf 230 °C (15 min)
Fraktionensammler:	PTF (Gerstel), T: 220 °C (Supply Pipe, Distributor), Kühlung der Fallen: 0 °C
Gas:	Wasserstoff, Trägergas: 5 mL min^{-1} , Hilfsgas 1 mL min^{-1} , Gegengas: 10 mL min^{-1}
Datenauswertung:	MCS 1.15 Auswertestation (Gerstel)

4.2.3. Gelchromatographie (GPC)

Pumpe:	High Precision Pump, Modell 300 (Gynkotek)
Degasser:	3-Kanal Degasser KT-37 (Shodex)
Detektor:	UV/VIS-Detektor SPD-6AV (Shimadzu) Wellenlänge: 280 nm
Integrator:	Chromatopac C-R3A (Shimadzu)
Injektionsventil:	Rheodyne-Ventil mit 2 mL Probenschleife
Säule:	Superdex 200 HR 10/30, 29,5 \times 1 cm, Partikelgröße: 13-15 μm , Trennbereich: 10-600 kDa, Ausschlußgrenze: $1,3 \times 10^3$ kDa (Pharmacia Biotech)
Flußrate:	0,75 mL min^{-1}

Fließmittel: 20 mM Tris-Puffer (pH 7,8), 0,1 % (w/v) Triton X-100R
Fraktionensammler: 17000 Minirac (LKB-Bromma)
Fraktionen: Intervalle von 2 min (1,5 mL)

4.2.4. Chromatographie an Hydroxylapatit (HAC)

FPLC-System: Bio-Rad Econo System: Econo-Pumpe EP-1, Econo-System Controller ES-1, Econo UV-Monitor EM-1, Econo Fraction Collector 2110, Injektionsventil Modell MV-6 mit 1 mL Proben-schleife
Schreiber: Linear Chart Recorder Modell 500
Säule: Bio-Gel HTP, 4 cm × 1 cm (Bio-Rad)
Flußrate: 1 mL min⁻¹
Fließmittel: A: 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6,8), 0,1 % (w/v) Triton X-100R
B: 400 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6,8), 0,1 % (w/v) Triton X-100R
Gradient: 0-5 min: 100 % A
5-40 min: linearer Anstieg auf 100 % B, 20 min halten
Fraktionen: Intervalle von 2 min (2 mL)

4.2.5. Ionenaustauschchromatographie (IEC)

FPLC-System: Bio-Rad Econo System: Econo-Pumpe EP-1, Econo-System Controller ES-1, Econo UV-Monitor EM-1, Econo Fraction Collector 2110, Injektionsventil Modell MV-6 mit 2 mL Proben-schleife
Schreiber: Linear Chart Recorder Modell 500
Säule: HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance, 10 × 1,6 cm, Partikelgröße: 24-44 µm (Pharmacia Biotech)
Flußrate: 3 mL min⁻¹
Fließmittel: A: 20 mM Tris-Puffer (pH 7,8), 0,1 % (w/v) Triton X-100R
B: 20 mM Tris-Puffer (pH 7,8), 1 M NaCl, 0,1 % (w/v) Triton X-100R

Gradient:	0-5 min:	100 % A
	5-30 min:	linearer Anstieg auf 20 % B
	30-50 min:	linearer Anstieg auf 100 % B, 20 min halten
Fraktionen:	Intervalle von 1,5 min (4,5 mL)	

Bei der verkürzten Enzymaufreinigung wurde der pH-Wert auf 7,2 abgesenkt (vgl. 2.8.3.), da die Hydroperoxid-Lyase im Alkalischen rasch an Aktivität verlor. Eine weitere Verringerung des pH-Wertes führte zu einer Verschlechterung der Trennung.

4.2.6. UV/VIS-Spektroskopie

Spektrophotometer:	Lambda 12 (Perkin-Elmer)
Datenauswertung:	UV Win Lab (Version 2.0)

4.3. Derivatisierung

4.3.1. Methylierung

Die Methylierung wurde mit Diazomethan in einer Apparatur nach [246] durchgeführt. Hierbei wurde durch Einleiten eines Stickstoffstroms in ein Zweiphasensystem mit 1 mL 2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol (99 %, Aldrich) und 1,5 mL 60 %iger KOH als unterer Phase sowie mit 2 mL 1 M Diazald (N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid, 99 %, Aldrich) in Diethylether und 1 mL Diethylether als oberer Phase Diazomethan entwickelt. Dieses wurde aus dem Reaktionsgefäß ausgetrieben und gelangte mit dem Gasstrom in das Probengefäß. Das Ende der Methylierung konnte bei farblosen Lösungen durch eine auftretende Gelbfärbung (Überschuß Diazomethan) erkannt werden. Bei gefärbten Lösungen erfolgte die Methylierung ca. 2-3 min.

4.3.2. Darstellung der O-Methyloxime

Die Probelösung wurde mit 200 µL wasserfreiem Pyridin (99,8 %, Aldrich) und einer kleinen Spatelspitze O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid (98 %, Fluka) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 10-12 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und die entstandenen O-Methyloxime durch Verreiben des Rückstandes mit Diethylether gelöst, die Etherphase abpipettiert und eingeeengt.

4.3.3. Silylierung

Die Silylierung erfolgte in einem 1 mL Glasfläschchen mit 250 μL Mikroeinsatz. Zu 50 μL der Probelösung wurden 50 μL MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid, Macherey & Nagel) zugegeben und das Fläschchen sofort mit einer Bördekappe verschlossen. Der Reaktionsansatz wurde ca. 12 h im Kühlschrank stehengelassen.

4.4. Synthesen

4.4.1. Darstellung von 13-HPOT

120-200 mg Linolensäure (99 %, Fluka) wurden mittels Ultraschallbad in 80 mL 0,1 M Natriumborat-Puffer (pH 9,0) emulgiert. Nach Zugabe von 2 mL Lipoxygenase-Lösung (ca. 3-4 mg mL^{-1}) erfolgte die Reaktion 20 min bei 0 °C (Eisbad) unter kontinuierlicher Einleitung von Sauerstoff auf einem Magnetrührer. Anschließend wurde der Ansatz in einen 100 mL Meßkolben überführt und mit Puffer zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration von 13-HPOT wurde nach geeigneter Verdünnung mit Methanol (HPLC-Qualität) spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 235 nm bestimmt (Quarzküvette, d: 1 cm). Für die Berechnung wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von 25.000 verwendet [19]. In der Regel wurde ein Umsatz > 95 % erzielt.

Zur Überprüfung der Reinheit wurden 5 mL des Reaktionsansatzes zur Festphasenextraktion an 500 mg RP-18 Kartuschen (Baker) eingesetzt. 13-HPOT wurde mit 10 mL Ameisensäuremethylester (99 %, Fluka) eluiert. Ein Aliquot wurde im Stickstoffstrom zur Trockne gebracht und in 10 mL *n*-Hexan (HPLC-Qualität) gelöst. Nach geeigneter Verdünnung erfolgte die Analytik mit HPLC-System 1.

13-HPOT wurde für jeden Versuchstag frisch hergestellt und der Reaktionsansatz als Substratlösung in den Inkubationsexperimenten mit Homogenaten und Rohextrakten aus Mungbohnenkeimlingen (bzw. anderen Pflanzen) verwendet.

4.4.2. Darstellung von 13-HPOD

Zur Reaktion wurden 40-50 mg Linolsäure (99 %, Fluka), emulgiert in 40 mL 0,1 M Natriumborat-Puffer (pH 9,0) und 2 mL Lipoxygenase-Lösung (ca. 2 mg mL^{-1}) eingesetzt. Die Umsetzung erfolgte 20 min bei 0 °C (Eisbad) unter kontinuierlicher Einleitung von Sauerstoff auf einem Magnetrührer. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M HCl

auf pH 5,0 abgesenkt und eine Festphasenextraktion an 1 g RP-18 Kartuschen (Baker) durchgeführt. 13-HPOD wurde mit 10 mL Methanol (HPLC-Qualität, Baker) in einen Meßkolben eluiert. Die Konzentration von 13-HPOD wurde photometrisch wie unter 4.4.1. beschrieben durchgeführt.

Die methanolische Lösung von 13-HPOD wurde in den Aktivitäts-Assays (vgl. 4.8.2.) als Substrat für die Hydroperoxid-Lyase verwendet. Sie wurde bei -30 °C gelagert und nach 2-3 Wochen erneuert.

4.4.3. Darstellung von *n*-Heptyljasmonat

n-Heptyljasmonat wurde durch Umesterung von Methyljasmonat (Aldrich) mit *n*-Heptanol (99 %, Fluka) in Gegenwart einer katalytischen Menge konzentrierter Schwefelsäure dargestellt. Die Reinigung erfolgte mittels präparativer Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel-Platten in dem Fließmittel Pentan/Dichlormethan (8:2, v/v). Der R_f Wert lag bei 0,48-0,52. Die gaschromatographische Analytik ergab eine Reinheit > 98 % und ein Isomeren-Verhältnis von 95:5 (*trans* : *cis*).

GC-Massenspektrum (EI) von *trans-n*-Heptyljasmonat [m/z (relative Intensität, %)]:

308 ($[M]^+$, 41), 290 (9), 261 (14), 240 (8), 210 (6), 193 (8), 192 (7), 191 (6), 164 (10), 163 (11), 151 (100), 150 (27), 83 (50), 57 (38), 55 (43), 43 (38), 41 (66).

GC-Massenspektrum (EI) von *cis-n*-Heptyljasmonat [m/z (relative Intensität, %)]:

308 ($[M]^+$, 41 %), 290 (27), 261 (36), 240 (10), 210 (5), 193 (10), 192 (15), 191 (16), 164 (12), 163 (16), 151 (86), 95 (44), 83 (75), 57 (62), 55 (62), 43 (57), 41 (100).

4.5. Verwendung von Leinöl als Ersatz für Linolensäure

4.5.1. Charakterisierung von Leinöl

4.5.1.1. Fettsäure-Verteilung

Die Fettsäure-Verteilung wurde durch Umesterung von Leinöl mit Natriummethylat ermittelt. In einem 10 mL Schraubglas wurde 1 mL des mit *n*-Hexan verdünnten Leinöls (1-2 mg mL⁻¹) mit 1 mL Heptadecansäuremethylester (0,5-0,8 mg mL⁻¹, 99 %, Fluka)

gelöst in *n*-Hexan als internen Standard versetzt. Nach Zugabe von 2 mL 1 % Na-Methylat-Lösung (Aldrich) erfolgte die Umesterung 30 min bei 50 °C im Trockenschrank. Die obere *n*-Hexan-Phase wurde nach Verdünnung zur gaschromatographischen Analytik eingesetzt (GC-System 1).

4.5.1.2. Verseifungszahl

Die Verseifungszahl ist als die Menge KOH (in mg) definiert, die zur Verseifung von 1 g Fett erforderlich ist.

1 g Leinöl wurde in einen 100 mL Rundkolben eingewogen und nach Zugabe von 20 mL ca. 0,5 M ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung 60 min unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde die noch heiße Lösung mit dem Indikator Phenolphthalein versetzt und mit 0,5 M Salzsäure bis zum Verschwinden der Rotfärbung titriert. Ein Blindversuch wurde unter den gleichen Bedingungen ohne Fetteinwaage durchgeführt. Die Verseifungszahl (VZ) wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Gl. 4-1:} \quad VZ = \frac{(b - a) \cdot N \cdot 56,1}{E}$$

a: Verbrauch an HCl im Hauptversuch in mL

b: Verbrauch an HCl im Blindversuch in mL

N: Konzentration der HCl (= 0,5 M)

E: Fetteinwaage in g

56,1: Molare Masse von KOH

Da unter diesen Bedingungen die Verseifung des Öls vollständig erfolgte, wurde die aus der Verseifungszahl berechnete Stoffmenge an Fettsäuren einem Hydrolysegrad von 100 % gleichgesetzt.

4.5.2. Enzymatische Hydrolyse von Leinöl

Leinöl wurde mit der Lipase aus *Candida rugosa* enzymatisch hydrolysiert. In Versuchen zur Optimierung der Reaktionsbedingungen (vgl. 2.7.2.) wurden 250 mg Leinöl mittels Ultraschallbad in 5 mL 0,2 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5) und 1 mL BSA-Lösung (ca. 10 mg mL⁻¹, 98 %, Fluka) emulgiert. Anschließend wurden 0,5 mL Lipase-

Lösung (ca. 40 mg mL⁻¹) zugegeben und 1,5 h bei 25 °C unter ständigem Rühren inkubiert. Sollte das Hydrolysat zur Gewinnung von 2*E*-Hexenal eingesetzt werden (vgl. 2.7.3.), so wurde der Reaktionsansatz auf 1 g Leinöl, 10 mL 0,2 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5) und 2 mL Lipase-Lösung vergrößert. Die Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren (vgl. 4.5.3.) erfolgte entweder in dem gesamten Ansatz (Optimierung der Hydrolyse-Bedingungen) oder in einem Aliquot, wenn der Rest des Hydrolysates als Substrat für die Lipoxigenase verwendet werden sollte.

4.5.3. Quantifizierung der hydrolysierten Fettsäuren

Die enzymatische Hydrolyse von Leinöl (vgl. 4.5.2.) wurde durch Zusatz von 4 mL Isopropanol/1 N H₂SO₄ (95:5, v/v) gestoppt und die Fettsäuren mit 6 mL *n*-Hexan extrahiert. 2 mL der oberen Phase wurden mit ca. 0,05 M ethanolischer KOH, deren exakte Konzentrationen durch Titration mit 0,05 M HCl (Maßlösung) bestimmt wurde, unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator titriert. Die Wiederfindung bei der Extraktion, die in Vorversuchen mit Palmitin- und Linolsäure ermittelt wurde, lag bei ca. 80 %. Das Ausmaß der enzymatischen Hydrolyse (*H*) wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Gl. 4-2: } H (\%) = \frac{FS_{\text{enzym.}}}{FS_{\text{VZ}}} \times 100$$

$FS_{\text{enzym.}}$: enzymatisch freigesetzte Fettsäuren (in mmol g⁻¹)

FS_{VZ} : Gesamtmenge an Fettsäuren in Leinöl (in mmol g⁻¹); über die Verseifungszahl (VZ) ermittelt (= 100 % Hydrolyse)

4.6. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

4.6.1. Keimung

Mungbohnen

40-50 g Mungbohnen wurden 1 h in Leitungswasser eingeweicht, mit frischem Wasser gewaschen und auf einem Tablett mit feuchter Watte ausgesät. Während der ersten 4 Tage erfolgte die Keimung unter perforierter Klarsichtfolie, die später entfernt wurde.

Die Keimlinge wurden täglich mit Leitungswasser gegossen und auf Schimmelbefall hin kontrolliert. Unter Standardbedingungen wurden die Keimlinge nach 10-16 d geerntet.

Luzerne

10 g Luzerne wurden auf einem Tablett mit feuchter Watte ausgesät und während der ersten 4 Tage mit perforierter Klarsichtfolie abgedeckt. Die Keimlinge wurden täglich mit Leitungswasser gegossen und nach 6 d geerntet.

4.6.2. Herstellung, Inkubation und Extraktion der Homogenate

5 g Mungbohnen- bzw. Luzernekeimlinge wurden in 50 mL 0,1 M Kaliumphosphat-Citrat-Puffer (pH 6,5, T: 4 °C) 90 s mit einem Ultraturrax homogenisiert. Das Homogenat wurde unter Nachspülen mit wenig Puffer in einen 280 mL verschließbaren Zentrifugenbecher überführt und unter Standardbedingungen mit 10 mL der Substratlösung (vgl. 4.4.1., ca. 50 μmol 13-HPOT, 10 mmol kg^{-1}) versetzt. Eine auftretende Erhöhung des pH-Wertes durch die alkalische Substratlösung wurde durch Zugabe von 1 M HCl korrigiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur auf einem Tischschüttler wurde das Homogenat mit Heptansäuremethylester (1. interner Standard) versetzt und 20 min bei 4 °C und 6.400 g (7.000 Upm) zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand der Zentrifugation dreimal mit 70 mL Pentan/Diethylether (1:1,12, v/v) extrahiert. Hierbei lag die Wiederfindung, die über den 1. internen Standard ermittelt wurde, bei ca. 80-90 %. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und durch Destillation an einer Vigreux-Kolonne (Wasserbadtemperatur: 40 °C) auf ca. 1-2 mL eingengt. Nach Zugabe von Nonansäuremethylester (2. interner Standard) zu dem Konzentrat wurden die Proben bis zur gaschromatographischen Analytik (GC-System 1) bei -20 °C gelagert. Die Quantifizierung erfolgte bezogen auf den 2. internen Standard unter Berücksichtigung der jeweiligen Responsefaktoren und unter Einbeziehung der Wiederfindung (1. IStd) bei der Extraktion.

In einem Blindversuch (Homogenat ohne Zugabe von 13-HPOT) wurde die Menge an 2E-Hexenal ermittelt, die während der Inkubation aus endogener Linolensäure gebildet wurde und zur Berechnung der molaren Umsatzrate subtrahiert.

In Versuchen zum Zeitverlauf der 2E-Hexenal-Bildung (vgl. 2.4.2.) wurde die Reaktion zum gewünschten Zeitpunkt durch Zugabe von Methanol bis zu einer Endkonzentration von 66 % (v/v) gestoppt. Vor der Extraktion mit Pentan/Diethylether wurde der Methanolgehalt in der Probe mit 5 % (w/v) NaCl-Lösung auf 20 % abgesenkt.

4.6.3. Herstellung, Inkubation und Extraktion der Rohextrakte

Mungbohnen

Zur Herstellung eines Rohextraktes wurden 5 g Mungbohnenkeimlinge in Gegenwart von 0,1 % (w/v) Triton X-100 in 50 mL 0,1 M Kaliumphosphat-Citrat-Puffer (pH 6,5, T: 4 °C) 90 s mit einem Ultraturrax homogenisiert. Das Homogenat wurde unter Nachspülen mit etwas Puffer in einen 280 mL Zentrifugenbecher überführt und anschließend 20 min bei 4 °C zentrifugiert (6.400 g, 7.000 Upm). Teilweise erfolgte vor der Zentrifugation eine Solubilisierungsphase der Hydroperoxid-Lyase von 30-90 min (vgl. 2.5.1, 2.5.2.). Der Überstand der Zentrifugation wurde filtriert, um beim Dekantieren aufgewirbelte Pflanzenpartikel abzutrennen, und mit 10 mL Substratlösung (ca. 50 μmol 13-HPOT, 10 mmol kg^{-1}) versetzt. Die Durchführung der Inkubation und Extraktion waren mit 4.6.2. identisch.

Abweichend hiervon wurden in 2.12.2-2.12.4 die Rohextrakte ohne Detergenz hergestellt.

Auberginen, Kartoffeln, Tomaten

400 g Pflanzenmaterial wurden in 350 mL 0,1 M Kaliumphosphat-Citrat-Puffer (pH 6,5, T: 4 °C), der 0,1 % (w/v) Triton X-100 enthielt, in einem Haushaltsmixer 3 min homogenisiert und 20 min bei 4 °C zentrifugiert (6.400 g, 7.000 Upm). Der Überstand wurde in 2 Aliquots aufgeteilt, von denen der eine Teil mit 15 mL Substratlösung (ca. 75 μmol 13-HPOT) versetzt wurde, während der andere Teil als Blindwert (ohne 13-HPOT) diente. Die Proben wurden 1 h bei RT in verschlossenen Gefäßen auf einem Tischschüttler inkubiert und anschließend, wie unter 4.9. beschrieben, extrahiert und analysiert.

4.6.4. Solubilisierung der Hydroperoxid-Lyase aus Mungbohnenkeimlingen

75-100 g Keimlinge (Enzymaufreinigung) bzw. 40-50 g Keimlinge (Immobilisierung) wurden in 250 mL bzw. 180 mL 0,1 M Kaliumphosphat-Citrat-Puffer (pH 6,5, T: +4 °C) in einem Haushaltsmixer 2 min vorzerkleinert und danach 1 min mit einem Ultraturrax homogenisiert. Nach Filtration des Homogenates durch ein Baumwolltuch wurde der resultierende Rohextrakt zur Gewinnung der Membranfraktion 45 min bei 30.000 g (18.000 Upm) und 1 °C zentrifugiert. Die Solubilisierung des Pellets erfolgte 45 min bei 0 °C (Eisbad) in Gegenwart von 0,5 % (w/v) Triton X-100R auf dem Magnetrührer. Als

Puffer wurden 10 mL Startpuffer, der für das chromatographische Trennverfahren benötigt wurde (Enzymaufreinigung), oder 7 mL des jeweiligen Kupplungspuffers (Immobilisierung) verwendet. Anschließend wurde zentrifugiert (Bedingungen: s. o.) und der Überstand (= Solubilisat) membranfiltriert (0,45 µm).

4.6.5. Aufkonzentrierung chromatographischer Fraktionen

Die Aufkonzentrierung enzymatisch aktiver Fraktionen, die während der Proteinaufreinigung aufgefangen wurden, erfolgte mittels Ultrafiltration (Cut off: 100 kDa) in Zentrifugationseinsätzen (Centriplus-100, Amicon) nach Instruktionen des Herstellers. Hierbei wurde gleichzeitig eine Umpufferung mit dem für den nächsten chromatographischen Trennschritt erforderlichen Puffer durchgeführt.

4.7. Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase

4.7.1. Vergleich der verschiedenen Gele

Konditionierung der Gele

Die Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase erfolgte in 2,5 mL Mobicol-Kartuschen (Mobitec, Göttingen) mit einer 35 µm Auslaßfritte und Luer-Lock Verschlüssen am oberen und unteren Ende. 250-300 µL (Bettvolumen) des jeweiligen Gels wurden mit 3 mL kaltem H₂O_{dest.} und 5 mL Kupplungspuffer konditioniert. Als Kupplungspuffer zur Immobilisierung des Enzyms auf UltraLink Iodoacetyl wurden 0,1 M Tris-Puffer (pH 8,5) und im Fall von Affi-Gel 10, Affi-Gel 15 sowie UltraLink Biosupport Medium (Azlacton) 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5) verwendet.

Immobilisierung

Jeweils 250 µL der Solubilisate, die mit den oben genannten Kupplungspuffern (mit 0,5 % (w/v) Triton X-100R) hergestellt wurden, wurden auf die konditionierten Gele gegeben. Durch Zugabe von 250 µL Kupplungspuffer (ohne Detergenz) wurde die Detergenzkonzentration auf 0,25 % abgesenkt. Die Immobilisierung wurde 1 h bei RT auf einem Tischschüttler (300 Upm) durchgeführt. In Intervallen von 5-10 min wurde das Gelbett zusätzlich durch manuelles Schütteln aufgewirbelt, um eine vollständige Durchmischung zu erzielen.

Elution der Gel-Kartuschen

Nach Ablassen der überstehenden Solubilisat-Lösung in einen 10 mL Meßkolben wurde die Kartusche mit 5 mL 1 M NaCl (in K-Phosphat-Puffer) und 0,1 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,0) (Auffüllen bis zur Marke) eluiert. Das Eluat wurde zur Bestimmung von nicht immobilisiertem Protein verwendet (Bradford-Assay, vgl. 4.8.1.1.). Bis zur Bestimmung der Enzymaktivität, die innerhalb von 1 h nach der Immobilisierung ausgeführt wurde (vgl. 4.8.2.1.), wurden die Kartuschen bei +4 °C gelagert.

Blockierung reaktiver Gruppen der Gele

Gemäß den Instruktionen der Hersteller ist eine Blockierung nach der Immobilisierung verbleibender reaktiver Gruppen vorgesehen, wobei als Reagenzien Cystein (UltraLink Iodoacetyl) oder Ethanolamin (Affi-Gel 10 und 15) verwendet werden. Da in Vorversuchen keine negativen Auswirkungen auf die Enzymaktivität festgestellt wurden, wurde auf die Blockierung verzichtet. Auf diese Weise konnte die Immobilisierung der instabilen Hydroperoxid-Lyase um 1 h verkürzt werden.

4.7.2. Immobilisierung im Mikro-Ansatz

In den Versuchen 2.9.2.-2.9.6. wurde UltraLink Iodoacetyl wegen der guten Kupplungseigenschaften als einziges Gel zur Immobilisierung der Hydroperoxid-Lyase eingesetzt. Im Gegensatz zu obigen Ausführungen (vgl. 4.7.1.) wurde unter optimierten Kupplungsbedingungen die Immobilisierung jedoch in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) durchgeführt. Das Gel- bzw. Solubilisatvolumen betrug jeweils 250-300 µL. Die Konzentration von Triton X-100R, das aus dem Solubilisat stammte, wurde durch Zusatz eines größeren Puffervolumens auf mindestens 0,15 % abgesenkt. Abweichungen von diesen Bedingungen werden im Text angegeben.

4.7.3. Immobilisierung im Makro-Ansatz

Zur Untersuchung der Lagerstabilität immobilisierter Hydroperoxid-Lyase (vgl. 2.9.5.) wurde der Immobilisierungsansatz vergrößert. Die Immobilisierung wurde in einer verschließbaren 15 mL Polyethylenkartusche mit Bodenfritte (Pierce) durchgeführt. 2,4 mL Solubilisat, dessen Detergenzkonzentration durch Zugabe von 4,8 mL 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) auf 0,1 % verringert worden war, und 2 mL UltraLink Iodoacetyl (Gelvolumen) wurden zur Immobilisierung eingesetzt. Nach einer Reak-

tionszeit von 75 min bei RT auf einem Tischschüttler wurde das Gel mit 10 mL 1 M NaCl (in K-Phosphat-Puffer) und 15 mL 0,1 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,0) gewaschen. Nach Entfernen des Puffers durch Anlegen eines leichten Vakuums wurde das Gel in 3 mL K-Phosphat-Puffer suspendiert und bei 4 °C gelagert. Zur Bestimmung der Enzymaktivität (vgl. 4.8.2.1.) wurde jeweils ein Aliquot von 500 µL der Suspension (= 200 µL Gelvolumen) entnommen.

4.8. Methoden der Enzymanalytik

4.8.1. Proteinbestimmung

4.8.1.1. Assay nach Bradford (Bio-Rad Protein Assay)

Der Assay nach Bradford basiert auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue. Hierbei tritt in saurer Lösung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm auf [247].

Der Assay wurde bei der Enzymimmobilisierung zur Bestimmung des Proteingehalts von Solubilisat und Eluat der Gel-Kartuschen (nicht immobilisiertes Protein) in der Mikro-Version eingesetzt. Die Detergenzkonzentration der Probelösungen wurde durch Verdünnung so verringert, daß keine Störungen bei dem Assay auftraten.

$(2 - x)$ mL $H_2O_{\text{dest.}}$, x mL Probelösung und 500 µL Farbstoff-Konzentrat wurden in einer 1 cm Einwegküvette gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 10 min bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm spektrophotometrisch gegen einen Blindwert gemessen. Der Blindwert enthielt anstelle der Probelösung x mL des jeweiligen Puffers. Die Eichgerade wurde mit Rinder-Serumalbumin (BSA) in einem Bereich von 1-25 µg mL⁻¹ (Konzentration in der Küvette) erstellt. Die Bestimmungsgrenze betrug 1,3 µg mL⁻¹ Probelösung.

4.8.1.2. Assay nach Lowry (Bio-Rad DC Protein Assay)

Prinzip dieses Assays ist die Reaktion von Proteinen mit einer alkalischen Kupfertartrat-Lösung und Folin Reagenz. Die bei der Reduktion des Folin Reagenz durch das Protein entstehenden Reaktionsprodukte besitzen ein Absorptionsmaximum von 750 nm [248, 249].

Da dieser Assay mit relativ hohen Detergenzkonzentrationen kompatibel war, wurde er im Rahmen der Proteinaufreinigung zur Proteinbestimmung in den chromatographischen Fraktionen und in dem Solubilisat verwendet.

Reagenz S: Natriumdodecylsulfat (SDS)

Reagenz A: alkalische Kupfertartrat-Lösung

Reagenz A': Mischung aus 20 μL Reagenz S und 1 mL Reagenz A

Reagenz B: Folin Reagenz

(0,5 – x) mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, x mL Probelösung, 0,25 mL Reagenz A' und 2 mL Reagenz B wurden in einer 1 cm Einwegküvette gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 15 min bei RT wurde die Extinktion bei 750 nm spektrophotometrisch gegen einen Blindwert gemessen. Der Blindwert enthielt anstelle der Probelösung x mL des jeweiligen Puffers. Die Eichgerade wurde mit Rinder-Serumalbumin (BSA) in einem Bereich von 5,2-52 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Konzentration in der Küvette) erstellt. Die Bestimmungsgrenze lag bei 28,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Probelösung.

Hinweis: Der Assay wurde stark durch 1 mM Dithiothreitol (DTT) gestört, so daß dieses Thiol nicht den Eluenten zugesetzt werden konnte.

4.8.2. Bestimmung der Enzymaktivität

4.8.2.1. GC-Assay

Die Aktivität der Hydroperoxid-Lyase wurde durch gaschromatographische Quantifizierung des gebildeten Hexanals ermittelt. 13-HPOD wurde gegenüber 13-HPOT als Substrat der Vorzug gegeben, da mit ersterem nur ein Produkt (Hexanal) gebildet wurde, während mit 13-HPOT ein Gemisch aus 3Z- und 2E-Hexenal erhalten wurde, von denen 3Z-Hexenal wegen eines starken Peaktailings schlecht integrierbar war.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität im Rohextrakt, Solubilisat und in den chromatographischen Fraktionen wurden 100-500 μL der gegebenenfalls verdünnten Probelösung in einem verschließbaren 8 mL Schraubfläschchen mit 0,1 M Kaliumphosphat-Citrat-Puffer (pH 6,5) auf ein Gesamtvolumen von 4 mL ergänzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μL einer methanolischen 13-HPOD-Lösung (ca. 1,5 μmol) gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei Raumtemperatur erfolgte durch Zusatz von 100 μL 1 M HCl ein Abbruch der Katalyse. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in ein verschraubbares Zentrifugenglas überführt, mit Heptansäuremethylester (1. interner Standard) versetzt und sofort mit 2 mL Pentan/Diethylether (1:1,12, v/v) extrahiert. Um die Phasentrennung zu beschleunigen, wurde kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Dem organischen Extrakt wurde Nonansäuremethylester als 2. interner Standard zugesetzt. Die Quantifizierung erfolgte bezogen auf den 2. internen Standard unter Berücksichtigung der jeweiligen Responsefaktoren und unter Einbeziehung der Wiederfindung (1. IStd) bei der Extraktion. In einem Blindversuch (ohne 13-HPOD) wurde die Menge an Hexanal ermittelt, die während der Inkubationszeit aus endogener Linolsäure gebildet wurde. Die gaschromatographische Analytik wurde mit GC-System 1 durchgeführt (vgl. 4.2.2.).

Immobilisierte Hydroperoxid-Lyase wurde in 4 mL 0,1 M Kaliumphosphat-Citrat-Puffer (pH 6,5), der 100 μL einer methanolischen 13-HPOD-Lösung (ca. 1,5 μmol) bzw. in 2.9.2.3. 200 μL Substrat enthielt, suspendiert und 3 min inkubiert. Die Inkubation erfolgte in 2,5 mL Mobicol-Kartuschen, deren Volumen durch Aufsatz einer 5 mL Polyethylen-Spritze vergrößert worden war. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Puffer durch Filtration über die Auslaßfritte vom Immobilisat abgetrennt und das zurückbleibende Gel mit 2 mL Puffer gewaschen. Die vereinigten Kartuschen-Eluate wurden wie oben beschrieben extrahiert und analysiert.

Definition der Enzymaktivität

1 *Unit (U)* Hydroperoxid-Lyase-Aktivität wird definiert als die Enzymmenge, die 1 μmol Hexanal pro Minute bildet. Die *spezifische Aktivität* wird in U mg^{-1} Protein angegeben.

4.8.2.2. UV-Assay

Der UV-Assay wurde nur zum schnellen qualitativen Nachweis Hydroperoxid-metabolisierender Enzyme in den chromatographischen Fraktionen verwendet. 50-100 μL der chromatographischen Fraktion wurden mit 2,2 mL 0,1 M Kaliumphosphat-Citrat-Puffer (pH 6,5) in einer Quarzküvette (d: 1 cm) gemischt. Nach Zugabe von 200 μL einer in Puffer (MeOH-Anteil: 1 %) gelösten ca. 150 μM 13-HPOD-Lösung (30 nmol) wurde die Abnahme der Extinktion bei 235 nm spektrophotometrisch verfolgt (T: 25 °C).

4.8.3. Berechnung der Aktivitäts- und Kupplungseffizienz

Die Aktivitätseffizienz (AE) wurde nach Gleichung 4-3 berechnet.

$$\text{Gl. 4-3: } AE (\%) = \frac{A_{imm.}}{A_0} \times 100$$

$A_{imm.}$: Aktivität des Immobilisates

A_0 : Aktivität in dem zur Immobilisierung eingesetzten Solubilisatvolumen

Die Kupplungseffizienz (KE) wurde nach Gleichung 4-4 berechnet.

$$\text{Gl. 4-4: } KE (\%) = \frac{P_{imm.}}{P_0} \times 100$$

$P_{imm.}$: immobilisiertes Protein, $P_{imm.} = P_0 - P_{Eluat}$

P_0 : zur Immobilisierung eingesetzte Proteinmenge

P_{Eluat} : nicht immobilisiertes Protein (Eluat der Gel-Kartuschen, vgl. 4.7.1.)

4.9. Quantifizierung flüchtiger und nichtflüchtiger Produkte des 13-HPOT-Metabolismus

Um die neben 2E-Hexenal bei der Inkubation mit 13-HPOT gebildeten Oxylipide zu isolieren, wurde der Rohextrakt (vgl. 4.6.3.) nach Zusatz von Heptansäuremethylester (1. interner Standard) mit 1 M HCl auf pH 4,0 angesäuert und dreimal mit 70 mL Pentan/Diethylether (1:1,12, v/v) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden

über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abtrennung vom Na_2SO_4 wurde der organische Extrakt in einem Meßkolben mit dem Extraktionslösungsmittel auf 250 mL aufgefüllt.

Zur Analytik von 2*E*-Hexenal wurde ein Aliquot der Probelösung von 50 mL durch Destillation an einer Vigreux-Kolonne (Wasserbadtemperatur: 40 °C) auf ca. 1-2 mL eingeeengt und mit Nonansäuremethylester (2. interner Standard) versetzt. Die Konzentration von 2*E*-Hexenal wurde gaschromatographisch mit GC-System 1 ermittelt (vgl. 4.2.2.). Die Berechnung wurde wie unter 4.6.2. beschrieben durchgeführt.

Die verbleibenden 200 mL des organischen Extraktes wurden für die Oxy lipid-Analytik verwendet und bei 30 °C unter Vakuum auf ca. 1 mL eingeeengt. Das Entfernen des Lösungsmittels mit dem Rotationsverdampfer erfolgte schonender für die Probe, da bei einer niedrigeren Temperatur gearbeitet wurde und der Vorgang nicht so zeitaufwendig war wie die Destillation an einer Vigreux-Kolonne. Der Rückstand wurde in ca. 5 mL Diethylether gelöst und mit Diazomethan methyliert (vgl. 4.3.1.). Anschließend wurde die Probelösung in einem 10 mL Meßkolben mit *n*-Hexan aufgefüllt und gegebenenfalls nach Verdünnung zur HPLC-Analytik (HPLC-System 2) eingesetzt (vgl. 4.2.1.).

Aufgrund eines Mangels an Referenzverbindungen wurde die Quantifizierung von 12-oxo-PDA bezogen auf *n*-Heptyljasmonat und die der geradkettigen Oxy lipide bezogen auf Ricinolsäuremethylester durchgeführt.

4.10. Hinweise zur Entsorgung

Der Verbrauch von Lösungsmitteln wurde durch die weitgehende Wiederverwendung nach Aufreinigung durch Destillation auf ein Minimum reduziert. Nach Möglichkeit wurde auf halogenierte Lösungsmittel verzichtet. Chemikalienreste sowie Lösungsmittelabfälle, die getrennt nach halogenierten, nicht halogenierten wassermischbaren und nicht halogenierten wasserunlöslichen Lösungsmitteln gesammelt wurden, wurden der zentralen Entsorgung der Universität Hannover zugeführt.

5. Literatur

- [1] Gardner, H. W.: Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants, *Biochim. Biophys. Acta*, (1991), 1084, 221-239.
- [2] Vick, B. A.: Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway. In: Moore Jr., T. S.: *Lipid Metabolism in Plants*, CRC Press, Boca Raton, (1993), 167-191.
- [3] Gardner, H. W.: Biological roles and biochemistry of the lipoxygenase pathway, *Hort. Sci.*, (1995), 30, 197-205.
- [4] Smith, W. L.; Fitzpatrick, F. A.: The eicosanoids: Cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In: Vance, D. E. und Vance, J. E.: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Elsevier, Amsterdam, (1996), 283-308.
- [5] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: Stumpf, P. K.: *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, Academic Press, Orlando, (1987), 53-90.
- [6] Hatanaka, A.: The biogeneration of green odour by green leaves, *Phytochemistry*, (1993), 34, 1201-1218.
- [7] Fauconnier, M. L.; Marlier, M.: Fatty acid hydroperoxides pathways in plants. A review, *Grasas Y Aceites*, (1997), 48, 30-37.
- [8] Phillips, D. R.; Matthew, J. A.; Reynolds, J.; Fenwick, G. R.: Partial purification and properties of a *cis*-3:*trans*-2-enal isomerase from cucumber fruit, *Phytochemistry*, (1979), 18, 401-404.
- [9] Hsieh, R. J.: Contribution of lipoxygenase pathway to food flavors. In: Ho, C.-T. und Hartmann, T. G.: *Lipids in Food Flavors*, ACS Symp. Ser., 558, ACS Press, Washington DC, (1994), 30-48.
- [10] Gardner, H. W.: How the lipoxygenase pathway affects the organoleptic properties of fresh fruit and vegetables. In: Min, D. B. und Smouse, T. H.: *Flavour Chemistry of Lipid Foods*, AOCS Press, Champaign, (1989), 98-112.
- [11] Whitehead, I. M.; Muller, B. L.; Dean, C.: Industrial use of soybean lipoxygenase for the production of natural green note flavor compounds, *Cereal Foods World*, (1995), 40, 193-197.
- [12] Hatanaka, A.: The fresh green odor emitted by plants, *Food Rev. Int.*, (1996), 12, 303-350.
- [13] Muller, B. L.; Dean, C.; Whitehead, I. M.: The industrial use of plant enzymes for the production of natural „green note“ flavour compounds. In: *INRA: Bioflavour '95*, INRA, Paris, (1995), 339-344.

- [14] Muller, B. L.; Gautier, A. E.: Green note production: a challenge for biotechnology. In: Maarse, H. und Heij, D. G. van der: *Trends in Flavour Research*, Elsevier, Amsterdam, (1994), 475-479.
- [15] Aromenverordnung i. d. F. der ÄndV vom 20.12.1993, § 1 (1) i. V. m. Anlage 1 Nr. 1, *BGBI. I*, S. 2304.
- [16] Sekiya, J.; Kajiwara, T.; Munechika, K.; Hatanaka, A.: Distribution of lipoxygenase and hydroperoxide lyase in the leaves of various plant species, *Phytochemistry*, (1983), 22, 1867-1869.
- [17] Berger, R. G.; Kler, A.; Drawert, F.: The C₆-aldehyde-forming system in *Agropyron repens*, *Biochim. Biophys. Acta*, (1986), 883, 523-530.
- [18] Drawert, F.; Kler, A.; Berger, R. G.: Biotechnologische Erzeugung von Aromastoffen. I. Optimierung der Ausbeute von (*E*)-2-Hexenal bei pflanzlichen Gewebehomogenaten, *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, (1986), 19, 426-431.
- [19] Almosnino, A. M.; Bensoussan, M.; Belin, J. M.: Unsaturated fatty acid bioconversion by apple pomace enzyme system. Factors influencing the production of aroma compounds, *Food Chem.*, (1996), 55, 327-332.
- [20] Holtz, R. B.; McCulloch, M. J.; Garger, S. J.; Teague, R. K.; Phillips, H. F.: Method for providing green note compounds. Patent: WO 95/26413 (1995).
- [21] Hamberg, M.; Samuelsson, B.: On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxygenase, *J. Biol. Chem.*, (1967), 242, 5329-5335.
- [22] Egmond, M. R.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G.; Boldingh, J.: On the positional specificity of the oxygenation reaction catalyzed by soybean lipoxygenase-1, *Biochim. Biophys. Acta*, (1975), 409, 399-401.
- [23] Axelrod, B.; Cheesbrough, T. M.; Laakso, S.: Lipoxygenase from soybeans, *Methods Enzymol.*, (1981), 71, 441-451.
- [24] Roza, M.; Francke, A.: Product specificity of soybean lipoxygenase, *Biochim. Biophys. Acta*, (1973), 316, 76-82.
- [25] Flemmer, A.: Bildung von Hexenalen bei verschiedenen Pflanzenhomogenaten durch das Enzymsystem Lipoxygenase - Hydroperoxid Lyase, Dissertation, Technische Universität München, (1991).
- [26] Garssen, G. J.; Vliegthart, J. F. G.; Boldingh, J.: An anaerobic reaction between lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxides, *Biochem. J.*, (1971), 122, 327-332.
- [27] Shibata, Y.; Matsui, K.; Kajiwara, T.; Hatanaka, A.: Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruits, *Plant Cell Physiol.*, (1995), 36, 147-156.

- [28] Shibata, Y.; Matsui, K.; Kajiwara, T.; Hatanaka, A.: Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1995), 207, 438-443.
- [29] Findley, J. B. C.: Purification of membrane proteins. In: Harris, E. L. V. und Angal, S.: *Protein Purification Applications - A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, (1990), 59-82.
- [30] Olias, J. M.; Rios, J. J.; Valle, M.; Zamora, R.; Sanz, L. C.; Axelrod, B.: Fatty acid hydroperoxide lyase in germinating soybean seedlings, *J. Agric. Food Chem.*, (1990), 38, 624-630.
- [31] Zimmerman, D. C.; Feng, P.: Characterization of a prostaglandin-like metabolite of linolenic acid produced by a flaxseed extract, *Lipids*, (1978), 13, 313-316.
- [32] Zimmerman, D. C.: A new product of linoleic acid oxidation by a flaxseed enzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1966), 23, 398-402.
- [33] Crombie, L.; Morgan, D. O.: Synthesis of [14,14-²H₂]-linolenic acid and its use to confirm the pathway to 12-oxophytodienoic acid (12-oxo-PDA) in plants: a conspectus of the epoxycarbonium ion derived family of metabolites from linoleic and linolenic acid hydroperoxides, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, (1991), 581-587.
- [34] Gardner, H. W.: persönliche Mitteilung, (1996).
- [35] Blee, E.; Wilcox, A. L.; Marnett, L. J.; Schuber, F.: Mechanism of reaction of fatty acid hydroperoxides with soybean peroxygenase, *J. Biol. Chem.*, (1993), 268, 1708-1715.
- [36] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: Levels of oxygenated fatty acids in young corn and sunflower plants, *Plant Physiol.*, (1982), 69, 1103-1108.
- [37] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: Lipoxygenase, hydroperoxide isomerase, and hydroperoxide cyclase in young cotton seedlings, *Plant Physiol.*, (1981), 67, 92-97.
- [38] Hamberg, M.; Gardner, H. W.: Oxylin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance, *Biochim. Biophys. Acta*, (1992), 1165, 1-18.
- [39] Hamberg, M.: Pathways in the biosynthesis of oxylin in plants, *J. Lipid Mediators*, (1993), 6, 375-384.
- [40] Grechkin, A. N.; Kuramshin, R. A.; Safonova, E. Y.; Latypov, S. K.; Ilyasov, A. V.: Formation of ketols from linolenic acid 13-hydroperoxide via allene oxide. Evidence for two distinct mechanisms of allene oxide hydrolysis, *Biochim. Biophys. Acta*, (1991), 1086, 317-325.

- [41] Einhellig, F. A.: Allelopathy: Current status and future goals. In: Dakshini, I. K. M. M. und Einhellig, F. A.: *Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications*, ACS Symp. Ser., 582, ACS Press, Washington DC, (1994), 1-24.
- [42] Andersen, R. A.; Hamilton-Kemp, T. R.; Hildebrand, D. F.; McCracken Jr., T. C.; Collins, R. W.; Fleming, P. D.: Structure-antifungal activity relationships among volatile C₆ and C₉ aliphatic aldehydes, ketones and alcohols, *J. Agric. Food Chem.*, (1994), 42, 1563-1568.
- [43] Kubo, A.; Lunde, C. S.; Kubo, I.: Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds, *J. Agric. Food Chem.*, (1995), 43, 1629-1633.
- [44] Gardner, H. W.; Dornbos Jr., D. L.; Desjardins, A. E.: Hexanal, *trans*-2-hexenal, and *trans*-2-nonenal inhibit soybean, *Glycine max*, seed germination, *J. Agric. Food Chem.*, (1990), 38, 1316-1320.
- [45] Hamilton-Kemp, T. R.; Loughrin, J. H.; Archbold, D. D.; Andersen, R. A.; Hildebrand, D. F.: Inhibition of pollen germination by volatile compounds including 2-hexenal and 3-hexenal, *J. Agric. Food Chem.*, (1991), 39, 952-956.
- [46] Bradow, J. M.: Relationships between chemical structure and inhibitory activity of C₆ through C₉ volatiles emitted by plant residues, *J. Chem. Ecol.*, (1991), 17, 2193-2212.
- [47] Charron, C. S.; Cantliffe, D. J.; Heath, R. R.: Volatile emissions from plants, *Horticultural Reviews*, (1995), 17, 43-72.
- [48] Metcalf, R. L.: Plant volatiles as insect attractants, *Crit. Rev. Plant Sci.*, (1987), 5, 251-301.
- [49] Scarpati, M. L.; Loscalzo, R.; Vita, G.: *Olea europaea* volatiles attractive and repellent to the olive fruit fly (*Dacus oleae* Gmelin), *J. Chem. Ecol.*, (1993), 19, 881-891.
- [50] Deng, W.; Hamilton-Kemp, T. R.; Nielsen, M. T.; Andersen, R. A.; Collins, G. B.; Hildebrand, D. F.: Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation, *J. Agric. Food Chem.*, (1993), 41, 506-510.
- [51] Zeringue, H. J.; Brown, R. L.; Neucere, J. N.; Cleveland, T. E.: Relationships between C₆-C₁₂ alkanal and alkenal volatile contents and resistance of maize genotypes to *Aspergillus flavus* and aflatoxin production, *J. Agric. Food Chem.*, (1996), 44, 403-407.
- [52] Hamilton-Kemp, T. R.; McCracken Jr., C. T.; Loughrin, J. H.; Andersen, R. A.; Hildebrand, D. F.: Effects of some natural volatile compounds on the pathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*, *J. Chem. Ecol.*, (1992), 18, 1083-1091.

- [53] Hildebrand, D. F.; Brown, G. C.; Jackson, D. M.; Hamilton-Kemp, T. R.: Effects of some leaf-emitted volatile compounds on aphid population increase, *J. Chem. Ecol.*, (1993), 19, 1875-1887.
- [54] Vaughn, S. F.; Gardner, H. W.: Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean, *J. Chem. Ecol.*, (1993), 19, 2337-2345.
- [55] Croft, K. P. C.; Juttner, F.; Slusarenko, A. J.: Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Plant Physiol.*, (1993), 101, 13-24.
- [56] Zimmerman, D. C.; Coudron, C. A.: Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-*trans*-10-dodecenoic acid, *Plant Physiol.*, (1979), 63, 536-541.
- [57] Drawert, F.; Heimann, W.; Emberger, R.; Tressl, R.: Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten. II. Enzymatische Bildung von Hexen-(2)-al-(1), Hexanal und deren Vorstufen, *Liebigs Ann. Chem.*, (1966), 694, 200-208.
- [58] Schreier, P.; Drawert, F.; Junker, A.: Über die quantitative Zusammensetzung natürlicher und technologisch veränderter pflanzlicher Aromen. III. Veränderungen und Neubildungen von Aromastoffen bei der Herstellung von Säften aus roten Johannisbeeren, *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, (1977), 10, 337-340.
- [59] Leffingwell, J. C.; Leffingwell, D.: GRAS Flavor Chemicals - detection thresholds, *Perfumer&Flavorist*, (1991), 16, 1-19.
- [60] Fazzalari, F. A.: *Compilation of Odor and Taste Threshold Values Data*, American Society for Testing and Materials (ASTM), Philadelphia, (1978).
- [61] Curtius, T.; Franzen, H.: Über die chemischen Bestandteile grüner Pflanzen. Über den Blätteraldehyd, *Liebigs Ann. Chem.*, (1912), 390, 89-121.
- [62] Ziegler, E.: *Die natürlichen und künstlichen Aromen*, Hüthig, Heidelberg, (1982).
- [63] Galliard, T.; Chan, H. W.-S.: Lipoxygenases. In: Stumpf, P. K.: *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, Academic Press, Orlando, (1980), 131-161.
- [64] Yang, G.; Schwarz, P. B.; Vick, B. A.: Purification and characterization of lipoxygenase isoenzymes in germinating barley, *Cereal Chem.*, (1993), 70, 589-595.
- [65] Poca, E.; Rabinovitch-Chable, H.; Cook-Moreau, J.; Pages, M.; Rigaud, M.: Lipoxygenases from *Zea mays* L. Purification and physicochemical characteristics, *Biochim. Biophys. Acta*, (1990), 1045, 107-114.
- [66] Gardner, H. W.: Lipoxygenase pathway in cereals, *Adv. Cereal Sci. Technol.*, (1988), 9, 161-215.

- [67] Matsui, K.; Toyota, H.; Kajiwara, T.; Kakuno, T.; Hatanaka, A.: Fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme, hydroperoxide lyase, from tea leaves, *Phytochemistry*, (1991), 30, 2109-2113.
- [68] Gardner, H. W.: Soybean lipoxygenase-1 enzymatically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, (1989), 1001, 274-281.
- [69] Kim, I.-S.; Grosch, W.: Partial purification of a lipoxygenase from apples, *J. Agric. Food Chem.*, (1979), 27, 243-246.
- [70] Kim, I.-S.; Grosch, W.: Lipoxygenasen aus Birnen, Erd- und Stachelbeeren: Partielle Reinigung und Eigenschaften, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, (1978), 167, 324-326.
- [71] Aarle, P. G. M. van; Barse, M. M. J. de; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G.: A partially purified lipoxygenase from barley (*Hordeum distichum*) forms (S)-9-hydroperoxy-10-trans,12-cis-octadecadienoic acid from linoleic acid. In: Quinn, P. J. und Harwood, J. L.: *Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilization*, Portland Press, London, (1990), 289-291.
- [72] Sekiya, J.; Kajiwara, T.; Hatanaka, A.: Volatile C₆-aldehyde formation via hydroperoxides from C₁₈-unsaturated fatty acids in etiolated alfalfa and cucumber seedlings, *Agric. Biol. Chem.*, (1979), 43, 969-980.
- [73] Jang, M. J.; Cho, I. Y.; Lee, S. K.: Characteristics and localization of lipoxygenase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit, *Agric. Chem. Biotechnol.*, (1995), 38, 414-421.
- [74] Rabinovitch-Chable, H.; Cook-Moreau, J.; Breton, J.-C.; Rigaud, M.: Purification of lipoxygenase and hydroperoxide dehydrase in flaxseed: interaction between these enzymatic activities, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992), 188, 858-864.
- [75] Galliard, T.; Phillips, D. R.: Lipoxygenase from potato tubers, *Biochem. J.*, (1971), 124, 431-438.
- [76] Nikolaev, V.; Reddanna, P.; Whelan, J.; Hildenbrandt, G.; Reddy, C. C.: Stereochemical nature of the products of linoleic acid oxidation catalyzed by lipoxygenases from potato and soybean, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1990), 170, 491-496.
- [77] Matthew, J. A.; Galliard, T.: Enzymic formation of carbonyls from linoleic acid in leaves of *Phaseolus vulgaris*, *Phytochemistry*, (1978), 17, 1043-1044.
- [78] Sekiya, J.; Kamiuchi, H.; Hatanaka, A.: Lipoxygenase, hydroperoxide lyase and volatile C₆-aldehyde formation from C₁₈-fatty acids during development of *Phaseolus vulgaris* L., *Plant Cell Physiol.*, (1982), 23, 631-638.

- [79] Olias, J. M.; Valle, M.: Lipoxygenase from lupin seed: Purification and characterization, *J. Sci. Food Agric.*, (1988), 45, 165-174.
- [80] Galliard, T.; Matthew, J. A.: Lipoxygenase-mediated cleavage of fatty acids to carbonyl fragments in tomato fruits, *Phytochemistry*, (1977), 16, 339-343.
- [81] Smith, J. J.; Linforth, R.; Tucker, G. A.: Soluble lipoxygenase isoforms from tomato fruit, *Phytochemistry*, (1997), 45, 453-458.
- [82] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings, *Plant Physiol.*, (1976), 57, 780-788.
- [83] Tressl, R.; Drawert, F.: Biogenesis of banana volatiles, *J. Agric. Food Chem.*, (1973), 21, 560-565.
- [84] Matsui, K.; Shibutani, M.; Hase, T.; Kajiwara, T.: Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B), *FEBS Lett.*, (1996), 394, 21-24.
- [85] Gardner, H. W.; Weisleder, D.; Plattner, R. D.: Hydroperoxide lyase and other hydroperoxide-metabolizing activity in tissues of soybean, *Glycine max*, *Plant Physiol.*, (1991), 97, 1059-1072.
- [86] Kim, I.-S.; Grosch, W.: Partial purification and properties of a hydroperoxide lyase from fruits of pear, *J. Agric. Food Chem.*, (1981), 29, 1220-1225.
- [87] Phillips, D. R.; Galliard, T.: Flavour biogenesis. Partial purification and properties of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from fruits of cucumber, *Phytochemistry*, (1978), 17, 355-358.
- [88] Matsui, K.; Shibata, Y.; Kajiwara, T.; Hatanaka, A.: Separation of 13- and 9-hydroperoxide lyase activities in cotyledons of cucumber seedlings, *Z. Naturforsch.*, (1989), 44 c, 883-885.
- [89] Schreier, P.; Lorenz, G.: Separation, partial purification and characterization of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from apple and tomato fruits, *Z. Naturforsch.*, (1982), 37 c, 165-173.
- [90] Galliard, T.; Phillips, D. R.; Reynolds, J.: The formation of *cis*-3-nonenal, *trans*-2-nonenal and hexanal from linoleic acid hydroperoxide isomers by a hydroperoxide cleavage enzyme system in cucumber (*Cucumis sativus*) fruits, *Biochim. Biophys. Acta*, (1976), 441, 181-192.
- [91] Vick, B. A.: Temporal and organ-specific expression of enzymes of fatty acid hydroperoxide metabolism in developing sunflower seedlings. In: Kader, J.-C. und Mazliak, P.: *Plant Lipid Metabolism.*, Kluwer, Dordrecht, (1995), 280-282.
- [92] Hatanaka, A.; Kajiwara, T.; Sekiya, J.; Inouye, S.: Solubilization and properties of the enzyme-cleaving 13-L-hydroperoxylinolenic acid in tea leaves, *Phytochemistry*, (1982), 21, 13-17.

- [93] Fauconnier, M. L.; Perez, A. G.; Sanz, C.; Marlier, M.: Purification and characterization of tomato leaf (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hydroperoxide lyase, *J. Agric. Food Chem.*, (1997), 45, 4232-4236.
- [94] Götz-Schmidt, E.-M.; Wenzel, M.; Schreier, P.: C₆-volatiles in homogenates from green leaves: Localization of hydroperoxide lyase activity, *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, (1986), 19, 152-155.
- [95] Berger, R. G.; Kler, A.; Drawert, F.: C₆-aldehyde formation from linolenic acid in fruit cells cultured in vitro, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, (1987), 8, 147-151.
- [96] Chou, S.-R.; Chin, C.-K.: Control of the production of *cis*-3-hexenal, lipid-derived flavor compound, by plant cell culture. In: Ho, C.-T. und Hartmann, T. G.: *Lipids in Food Flavors*, ACS Symp. Ser., 558, ACS Press, Washington DC, (1994), 282-291.
- [97] Sekiya, J.; Hatanaka, A.: *cis*-3-hexenal and *n*-hexenal formation from linolenic and linoleic acids in alfalfa cells cultured in vitro, *Plant Sci. Lett.*, (1977), 10, 165-169.
- [98] Muller, B.; Gautier, A.; Dean, C.; Kuhn, J. C.: Enzymic method of forming aliphatic alcohols and aldehydes. Patent: WO 93/24644 (1993).
- [99] Zhuang, H.; Hamilton-Kemp, T. R.; Andersen, R. A.; Hildebrand, D. F.: Developmental change in C₆-aldehyde formation by soybean leaves, *Plant Physiol.*, (1992), 100, 80-87.
- [100] Hatanaka, A.; Kajiwara, T.; Sekiya, J.: Fatty acid hydroperoxide lyase in plant tissues. In: Parliment, T. H. und Croteau, R.: *Biogenesis of Aromas*, ACS Symp. Ser., 317, ACS Press, Washington DC, (1986), 167-175.
- [101] Wardale, D. A.; Lambert, E. A.; Galliard, T.: Localization of fatty acid hydroperoxide cleavage activity in membranes of cucumber fruit, *Phytochemistry*, (1978), 17, 205-212.
- [102] Galliard, T.; Phillips, D. R.: The enzymatic cleavage of linoleic acid to C₉ carbonyl fragments in extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and the possible role of lipoxygenase, *Biochim. Biophys. Acta*, (1976), 431, 278-287.
- [103] Riley, J. C. M.; Willemot, C.; Thompson, J. E.: Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening tomato fruit, *Postharvest Biol. Technol.*, (1996), 7, 97-107.
- [104] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts, *Plant Physiol.*, (1987), 85, 1073-1078.
- [105] Hatanaka, A.; Kajiwara, T.; Sekiya, J.: Biosynthesis of *trans*-2-hexenal in chloroplasts from *Thea sinensis*, *Phytochemistry*, (1976), 15, 1125-1126.

- [106] Blee, E.; Joyard, J.: Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides, *Plant Physiol.*, (1996), 110, 445-454.
- [107] Matsui, K.; Shibata, Y.; Tateba, H.; Hatanaka, A.; Kajiwara, T.: Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation, *Biosci. Biotech. Biochem.*, (1997), 61, 119-201.
- [108] Matsui, K.; Kaji, Y.; Kajiwara, T.; Hatanaka, A.: Developmental changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in cultured cells of *Marchantia polymorpha*, *Phytochemistry*, (1996), 41, 177-182.
- [109] Fauconnier, M. L.; Marlier, M.: Purification of soybean lipoxygenase isoenzyme-1 and characterization of its inhibition by 13-hydroperoxides, *Grasas Y Aceites*, (1996), 47, 242-246.
- [110] Kim, M. R.; Kim, S. H.; Sok, D. E.: Inactivation of potato lipoxygenase by hydroperoxy acids as suicide substrates, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1989), 164, 1384-1390.
- [111] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: Metabolism of fatty acid hydroperoxides by *Chlorella pyrenoidosa*, *Plant Physiol.*, (1989), 90, 125-132.
- [112] Nunez, A.; Foglia, T. A.; Piazza, G. J.: Improved method for extraction of hydroperoxide lyase from *Chlorella*, *Biotechnol. Techniques*, (1995), 9, 613-616.
- [113] Piazza, G. J.; Nunez, A.: Oxidation of acylglycerols and phosphoglycerides by soybean lipoxygenase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (1995), 72, 463-466.
- [114] Piazza, G. J.; Foglia, T. A.; Nunez, A.: Soybean lipoxygenase-promoted oxidation of free and esterified linoleic acid in the presence of deoxycholate, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (1996), 73, 1045-1049.
- [115] Brash, A. R.; Ingram, C. D.; Harris, T. M.: Analysis of a specific oxygenation reaction of soybean lipoxygenase-1 with fatty acids esterified in phospholipids, *Biochemistry*, (1987), 26, 5465-5471.
- [116] Virto, M. D.; Agud, I.; Montero, S.; Blanco, A.; Solozabal, R.; Lascaray, J. M.; Llama, M. J.; Serra, J. L.; Landeta, L. C.; Renobales, M. de: Kinetic properties of soluble and immobilized *Candida rugosa* lipase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (1995), 50, 127-136.
- [117] Linfield, W. M.; O'Brien, D. J.; Serota, S.; Barauskas, R. A.: Lipid-lipase interactions. I. Fat splitting with lipase from *Candida rugosa*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (1984), 61, 1067-1071.

- [118] Montero, S.; Blanco, A.; Virto, M. D.; Landeta, C.; Agud, I.; Solozabal, R.; Lascaray, J. M.; Renobales, M. de; Llama, M. J.; Serra, J. L.: Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme, *Enzyme Microb. Technol.*, (1993), 15, 239-247.
- [119] Schilstra, M. J.; Veldink, G. A.; Verhagen, J.; Vliegthart, F. G.: Effect of lipid hydroperoxide on lipoxygenase kinetics, *Biochemistry*, (1992), 31, 7692-7699.
- [120] Malcata, F. X.; Reyes, H. R.; Garcia, H. S.; Hill Jr., C. G.; Amundson, C. H.: Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils - a review, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (1990), 67, 890-910.
- [121] Ballesteros, A.; Bornscheuer, U.; Capewell, A.; Combes, D.; Condoret, J.-S.; Koenig, K.; Kolisis, F. N.; Marty, A.; Menge, U.; Scheper, T.; Stamatis, H.; Xenakis, A.: Enzymes in non-conventional phases, *Biocatalysis and Biotransformation*, (1995), 13, 1-42.
- [122] Pencreach, G.; Baratti, J. C.: Activity of *Pseudomonas cepacia* lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (1997), 47, 630-635.
- [123] Chen, J.-P.: Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase, *J. Ferment. Bioeng.*, (1996), 82, 404-407.
- [124] Perraud, R.; Laboret, F.: Optimization of methyl propionate production catalysed by *Mucor miehei* lipase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (1995), 44, 321-326.
- [125] Cavaille-Lefebvre, D.; Combes, D.; Rehbock, B.; Berger, R. G.: A chromatographic and mass-spectrometric approach for the analysis of lipase-produced thioester derivatives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (1998), 49, 136-140.
- [126] Pastor, E.; Otero, C.; Ballesteros, A.: Synthesis of mono- and dioleoylglycerols using an immobilized lipase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (1995), 50, 251-263.
- [127] Fukunaga, K.; Minamijima, N.; Sugimura, Y.; Zhang, Z. Z.; Nakao, K.: Immobilization of organic solvent-soluble lipase in nonaqueous conditions and properties of the immobilized enzymes, *J. Biotechnol.*, (1996), 52, 81-88.
- [128] Laakso, S.: Immobilized lipoxygenase in continuous production of fatty acid hydroperoxides, *Lipids*, (1982), 17, 667-671.
- [129] Piazza, G. J.; Medina, M. B.: Covalent immobilization of enzymes using commercially available CDI-activated agarose, *Methods Biotechnol.*, (1997), 1, 299-308.
- [130] Pinto, M. C.; Macias, P.: Synthesis of linoleic acid hydroperoxide using immobilized lipoxygenase in polyacrylamide gel, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (1996), 59, 309-318.

- [131] Hsu, A. F.; Foglia, T. A.; Piazza, G. J.: Immobilization of lipoxygenase in an alginate-silicate solgel matrix: Formation of fatty acid hydroperoxides, *Biotechnol. Lett.*, (1997), 19, 71-74.
- [132] Piazza, G. J.; Brower, D. P.; Parra-Diaz, D.: Synthesis of fatty acid hydroperoxide in the presence of organic solvent using immobilized lipoxygenase, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, (1994), 19, 243-252.
- [133] Parra-Diaz, D.; Brower, D. P.; Medina, M. B.; Piazza, G. J.: A method for immobilization of lipoxygenase, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, (1993), 18, 359-367.
- [134] Hammen, S.: Kovalente Immobilisierung von Lipoxygenase aus Sojabohnen EC 1.13.11.12, Typ 1-B, Diplomarbeit, Universität Hannover, (1997).
- [135] Pinto, M. D.; Gata, J. L.; Macias, P.: Immobilization of potato tuber lipoxygenase on oxirane acrylic beads, *Biotechnol. Prog.*, (1997), 13, 394-398.
- [136] Battu, S.; Cook-Moreau, J.; Beneytout, J. L.: Stabilization of potato tuber lipoxygenase on talc, *Biochim. Biophys. Acta*, (1994), 1211, 270-276.
- [137] Battu, S.; Rabinovitch-Chable, H.; Beneytout, J. L.: Effectiveness of talc as adsorbent for purification and immobilization of plant lipoxygenases, *J. Agric. Food Chem.*, (1994), 42, 2115-2119.
- [138] Liagre, B.; Battu, S.; Rigaud, M.; Beneytout, J. L.: Effectiveness of talc as adsorbent for stabilization and expression of *Pisum sativum hortense* cv. *Solara* lipoxygenase-lyase coupled activities, *J. Agric. Food Chem.*, (1996), 44, 2057-2062.
- [139] Nunez, A.; Armand, G. St.; Foglia, T. A.; Piazza, G. J.: Immobilization of hydroperoxide lyase from *Chlorella*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, (1997), 25, 75-80.
- [140] Nunez, A.; Foglia, T. A.; Piazza, G. J.: Immobilization of hydroperoxide lyase from *Chlorella* for the production of C₁₃ oxo-carboxylic acid. In: Williams, J. P.; Khan, M. U. und Lem, N. W.: *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*, Kluwer, Dordrecht, (1997), 96-98.
- [141] Price, N. C.: Techniques for enzyme extraction. In: Eienthal, R. und Danson, M. J.: *Enzyme Assays - A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, (1995), 255-275.
- [142] Jagow, G. von; Link, T. A.; Schägger, H.: Purification strategies for membrane proteins. In: Jagow, G. von und Schägger, H.: *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, (1994), 3-21.
- [143] Suelter, C. H.: *Experimentelle Enzymologie - Grundlagen für die Laborpraxis*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, (1990), 56-118.
- [144] Suelter, C. H.: *Experimentelle Enzymologie - Grundlagen für die Laborpraxis*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, (1990), 1-24.

- [145] Whitaker, J. R.: *Principles of the Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker, New York, (1994), 29-61.
- [146] Ruttloff, H.: *Industrielle Enzyme*. Behr's Verlag, Hamburg, (1994), 449-495.
- [147] Scouten, W. H.: A survey of enzyme coupling techniques, *Methods Enzymol.*, (1987), 135, 30-65.
- [148] Buchholz, K.; Kasche, V.: *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*. VCH, Weinheim, (1997), 141-190.
- [149] Matsui, K.; Kajiwara, T.; Hatanaka, A.: Inactivation of tea leaf hydroperoxide lyase by fatty acid hydroperoxide, *J. Agric. Food Chem.*, (1992), 40, 175-178.
- [150] Gardner, H. W.; Plattner, R. D.: Linoleate hydroperoxides are cleaved heterolytically into aldehydes by a Lewis acid in aprotic solvent, *Lipids*, (1984), 19, 294-299.
- [151] Lee, W. A.; Bruice, T. C.: Homolytic and heterolytic oxygen-oxygen bond scissions accompanying oxygen transfer to iron(III) porphyrins by percarboxylic acids and hydroperoxides. A mechanistic criterion for peroxidase and cytochrome P-450, *J. Am. Chem. Soc.*, (1985), 107, 513-514.
- [152] Traylor, T. G.; Fann, W.-P.; Bandyopadhyay, D.: A common heterolytic mechanism for reactions of iodosobenzenes, peracids, hydroperoxides, and hydrogen peroxide with iron(III) porphyrins, *J. Am. Chem. Soc.*, (1989), 111, 8009-8010.
- [153] Blake, R. C.; Coon, M. J.: On the mechanism of action of cytochrome P-450: Evaluation of homolytic and heterolytic mechanisms of oxygen-oxygen bond cleavage during substrate hydroxylation by peroxides, *J. Biol. Chem.*, (1981), 256, 12127-12133.
- [154] Thompson, J. A.; Wand, M. D.: Interaction of cytochrome P-450 with a hydroperoxide derived from butylated hydroxytoluene: Mechanism of isomerization, *J. Biol. Chem.*, (1985), 260, 10637-10644.
- [155] Liebler, D. C.; Guengerich, F. G.: Olefin oxidation by cytochrome P-450: Evidence for group migration in catalytic intermediates formed with vinylidene chloride and *trans*-1-phenyl-1-butene, *Biochemistry*, (1983), 22, 5482-5489.
- [156] Song, W. C.; Baertschi, S. W.; Boeglin, W. E.; Harris, T. M.; Brash, A. R.: Formation of epoxyalcohols by a purified allene oxide synthase. Implications for the mechanism of allene oxide synthesis, *J. Biol. Chem.*, (1993), 268, 6293-6298.
- [157] Hatanaka, A.; Kajiwara, T.; Sekiya, J.; Fukumoto, T.: Oxygen-isotope effect in enzymatic cleavage reaction of 13-L-hydroperoxylinoleic acid to hexanal and 11-formyl-*cis*-9-undecenoic acid, *Z. Naturforsch.*, (1982), 37c, 752-757.

- [158] Hatanaka, A.; Kajiwar, T.; Sekiya, J.; Toyota, H.: Oxygen incorporation in cleavage of ¹⁸O-labeled 13-hydroperoxylinoleyl alcohol into 12-hydroxy-(3Z)-dodecenal in tea chloroplasts, *Z. Naturforsch.*, (1986), 41c, 359-362.
- [159] Gardner, H. W.; Weisleder, D.; Kleiman, R.: Addition of N-acetylcysteine to linoleic acid hydroperoxide, *Lipids*, (1976), 11, 127-134.
- [160] Gardner, H. W.; Kleiman, R.; Weisleder, D.; Inglett, G. E.: Cysteine adds to lipid hydroperoxide, *Lipids*, (1977), 12, 655-660.
- [161] Gardner, H. W.: Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review, *J. Agric. Food Chem.*, (1979), 27, 220-229.
- [162] Gardner, H. W.: Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. Enzymic reactions compared with nonenzymic, *J. Agric. Food Chem.*, (1975), 23, 129-136.
- [163] Hidalgo, F. J.; Kinsella, J. E.: Changes induced in β -lactoglobulin B following interactions with linoleic acid 13-hydroperoxide, *J. Agric. Food Chem.*, (1989), 37, 860-866.
- [164] O'Brien, P. J.: Oxidation of lipids in biological membranes and intracellular consequences. In: Chan, H. W.-S.: *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, Academic Press, London, (1987), 233-280.
- [165] Karuzina, I. I.; Archakov, A. I.: The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions, *Free Radical Biol. Med.*, (1994), 16, 73-97.
- [166] He, K.; Falick, A. M.; Chen, B.; Nilsson, F.; Correia, M. A.: Identification of the heme adduct and an active site peptide modified during mechanism-based inactivation of rat liver cytochrome P450 2B1 by Secobarbital, *Chem. Res. Toxicol.*, (1996), 9, 614-622.
- [167] Fridovich, I.: Biological effects of the superoxide radical, *Arch. Biochem. Biophys.*, (1986), 247, 1-11.
- [168] Czapski, G.: Reaction of \cdot OH, *Methods Enzymol.*, (1984), 105, 209-215.
- [169] Brunori, M.; Rotilio, G.: Biochemistry of oxygen radical species, *Methods Enzymol.*, (1984), 105, 22-35.
- [170] Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.: Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts, *Arch. Biochem. Biophys.*, (1986), 246, 501-514.
- [171] Pan, Z.; Durst, F.; Werck-Reichhart, D.; Gardner, H. W.; Camara, B.; Cornish, K.; Backhaus, R. A.: The major protein of guayule rubber particles is a cytochrome P450. Characterization based on cDNA cloning and spectroscopic analysis of the solubilized enzyme and its reaction products, *J. Biol. Chem.*, (1995), 270, 8487-8494.

- [172] Simpson, T. D.; Gardner, H. W.: Allene oxide synthase and allene oxide cyclase, enzymes of the jasmonic acid pathway, localized in *Glycine max* tissues, *Plant Physiol.*, (1995), 108, 199-202.
- [173] Grechkin, A. N.; Kuramshin, R. A.; Safonova, E. Y.; Mukhtarova, L. S.; Latypov, S. K.; Ilyasov, A. V.: The keto-enol tautomerism and the redox conversions of α -ketol fatty acids, *Chem. Phys. Lipids*, (1993), 66, 199-208.
- [174] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.; Weisleder, D.: Thermal alteration of a cyclic fatty acid produced by a flaxseed extract, *Lipids*, (1979), 14, 734-740.
- [175] Brash, A. R.; Song, W. C.: Detection, assay, and isolation of allene oxide synthase, *Methods Enzymol.*, (1996), 272, 250-259.
- [176] Hansen, S. L.; Artz, W. E.: The evaporative light-scattering detector, *Inform*, (1995), 6, 170-176.
- [177] Macrae, R.: Light scattering detectors for use with HPLC, *Internat. Analyst*, (1987), 1, 14-15, 21-22, 24.
- [178] Dreux, M.; Lafosse, M.: Evaporative light scattering detection of carbohydrates in HPLC. In: Rassi, Ziad El: *Carbohydrate Analysis*, Elsevier, Amsterdam, (1995), 515-540.
- [179] Moreau, R. A.: Quantitative analysis of lipids by HPLC with a flame-ionization detector or an evaporative light-scattering detector. In: Shibamoto, T.: *Lipid Chromatographic Analysis*, Marcel Dekker, New York, (1994), 251-272.
- [180] Olsson, N. U.; Salem Jr., N.: Contemporary phospholipid analysis, *Lipid Technol.*, (1995), 7, 42-45.
- [181] Picchioni, G. A.; Watada, A. E.; Whitaker, B. D.: Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of plant phospholipids and glycolipids using light-scattering detection, *Lipids*, (1996), 31, 217-221.
- [182] Chase Jr., G. W.; Akoh, C. C.; Eitenmiller, R. R.: Analysis of tocopherols in vegetable oils by high-performance liquid chromatography: comparison of fluorescence and evaporative light-scattering detection, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (1994), 71, 877-880.
- [183] Warner, K.; Mounts, T. L.: Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (1990), 67, 827-831.
- [184] Mengerink, Y.; Man, H. C. J. de; Wal, S. van der: Use of an evaporative light scattering detector in reversed-phase high-performance liquid chromatography of oligomeric surfactants, *J. Chromatogr.*, (1991), 552, 593-604.

- [185] Rehbock, B.; Ganßer, D.; Berger, R. G.: Analysis of oxylipins by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection and particle beam mass spectrometry, *Lipids*, (1997), 32, 1003-1010.
- [186] Rehbock, B.; Ganßer, D.; Berger, R. G.: Different detection systems for the HPLC analysis of oxylipins, by-products of the enzymatic generation of 2E-hexenal, *Fres. J. Anal. Chem.*, (1998), im Druck.
- [187] Charlesworth, J. M.: Evaporative analyzer as a mass detector for liquid chromatography, *Anal. Chem.*, (1978), 50, 1414-1420.
- [188] Mourey, T. H.; Oppenheimer, L. E.: Principles of operation of an evaporative light-scattering detector for liquid chromatography, *Anal. Chem.*, (1984), 56, 2427-2434.
- [189] Liu, J.; Lee, T.; Bobik Jr., E.; Guzman-Harty, M.; Hastilow, C.: Quantitative determination of monoglycerides and diglycerides by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (1993), 70, 343-347.
- [190] Gerard, H. C.; Moreau, R. A.; Fett, W. F.; Osman, S. F.: Separation and quantitation of hydroxy and epoxy fatty acids by high-performance liquid chromatography with an evaporative light-scattering detector, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (1992), 69, 301-304.
- [191] Yang, B.; Chen, J.: Analysis of neutral lipids and glycerolysis products from olive oil by liquid chromatography, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (1991), 68, 980-982.
- [192] Oppenheimer, L. E.; Mourey, T. H.: Examination of the concentration response of evaporative light-scattering mass detectors, *J. Chromatogr.*, (1985), 323, 297-304.
- [193] Miyashita, K.; Fujimoto, K.; Kaneda, T.: Structures of dimers produced from methyl linoleate during initial stage of autoxidation, *Agric. Biol. Chem.*, (1982), 46, 2293-2297.
- [194] Neff, W. E.; Frankel, E. N.; Fujimoto, K.: Autoxidative dimerization of methyl linolenate and its monohydroperoxides, hydroperoxy epidioxides and dihydroperoxides, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (1988), 65, 616-623.
- [195] Garssen, G. J.; Vliegthart, J. F. G.; Boldingh, J.: The origin and structures of dimeric fatty acids from the anaerobic reaction between soya-bean lipoxigenase, linoleic acid and its hydroperoxide, *Biochem. J.*, (1972), 130, 435-442.
- [196] Gardner, H. W.: Reactions of hydroperoxides - products of high molecular weight. In: Chan, H. W.-S.: *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, Academic Press, London, (1987), 51-93.

- [197] Gardner, H. W.: Effects of lipid hydroperoxides on food components. In: Finley, J. W. und Schwass, D. E.: *Xenobiotics in Food and Feed*, ACS Symp. Ser., 234, ACS Press, Washington DC, (1983), 63-84.
- [198] Shimasaki, H.; Ueta, N.; Privett, O. S.: Covalent binding of peroxidized linoleic acid to protein and amino acids as models for lipofuscin formation, *Lipids*, (1982), 17, 878-883.
- [199] Pokorny, J.; Reblova, Z.; Kourimska, L.; Pudil, F.; Kwiatkowska, A.: Effect of interactions with oxidized lipids on structure change and properties of food proteins. In: Schwenke, K. D. und Mothes, R.: *Food Proteins: Structure and Functionality*, VCH, Weinheim, (1993), 232-235.
- [200] Song, W.-C.; Brash, A. R.: Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450, *Science*, (1991), 253, 781-784.
- [201] Song, W.-C.; Funk, C. D.; Brash, A. R.: Molecular cloning of an allene oxide synthase: A cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1993), 90, 8519-8523.
- [202] Lau, S.-M. C.; Harder, P. A.; O'Keefe, D. P.: Low carbon monoxide affinity allene oxide synthase is the predominant cytochrome P450 in many plant tissues, *Biochemistry*, (1993), 32, 1945-1950.
- [203] Hamberg, M.: Mechanism of corn hydroperoxide isomerase: detection of 12,13(*S*)-oxido-9(*Z*),11-octadecadienoic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, (1987), 920, 76-84.
- [204] Brash, A. R.; Baertschi, S. W.; Ingram, C. D.; Harris, T. M.: Isolation and characterization of natural allene oxides: Unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1988), 85, 3382-3386.
- [205] Grechkin, A. N.: Cyclization of natural allene oxide fatty acids. The anchimeric assistance of β,γ -double bond beside the oxirane and the reaction mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, (1994), 1213, 199-206.
- [206] Hamberg, M.; Fahlstadius, P.: Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.*, (1990), 276, 518-526.
- [207] Hamberg, M.: Biosynthesis of 12-oxo-10,15(*Z*)-phytodienoic acid: identification of an allene oxide cyclase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1988), 156, 543-550.
- [208] Ziegler, J.; Hamberg, M.; Miersch, O.; Parthier, B.: Purification and characterization of allene oxide cyclase from dry corn seeds, *Plant Physiol.*, (1997), 114, 565-573.

- [209] Baertschi, S. W.; Ingram, C. D.; Harris, T. M.; Brash, A. R.: Absolute configuration of *cis*-12-oxophytodienoic acid of flaxseed: implications for the mechanism of biosynthesis from the 13(*S*)-hydroperoxide of linolenic acid, *Biochemistry*, (1988), 27, 18-24.
- [210] Ziegler, J.; Hamberg, M.; Miersch, O.: Allene oxide cyclase from corn: Partial purification and characterization. In: Williams, J. P.; Khan, M. U. und Lem, N. W.: *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*, Kluwer, Dordrecht, (1997), 99-101.
- [211] Blee, E.; Durst, F.: Hydroperoxide-dependent sulfoxidation catalyzed by soybean microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, (1987), 254, 43-52.
- [212] Blee, E.; Schuber, F.: Efficient oxidation of unsaturated fatty acids by a hydroperoxide-dependent oxygenase, *J. Biol. Chem.*, (1990), 265, 12887-12894.
- [213] Ishimaru, A.; Yamazaki, I.: Hydroperoxide-dependent hydroxylation involving „H₂O₂-reducible hemoprotein“ in microsomes of pea seeds, *J. Biol. Chem.*, (1977), 252, 6118-6124.
- [214] Hamberg, M.; Hamberg, G.: Peroxygenase-catalyzed fatty acid epoxidation in cereal seeds, *Plant Physiol.*, (1996), 110, 807-815.
- [215] Hamberg, M.; Hamberg, G.: Hydroperoxide-dependent epoxidation of unsaturated fatty acids in the broad bean (*Vicia faba* L.), *Arch. Biochem. Biophys.*, (1990), 283, 409-416.
- [216] Zimmerman, D. C.; Vick, B. A.: Hydroperoxide isomerase. A new enzyme of lipid metabolism, *Plant Physiol.*, (1970), 46, 445-453.
- [217] Feng, P.; Zimmerman, D. C.: Substrate specificity of flax hydroperoxide isomerase, *Lipids*, (1979), 14, 710-713.
- [218] Feng, P.; Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: Formation of γ -ketols from 13- and 9-hydroperoxides of linolenic acid by flaxseed hydroperoxide isomerase, *Lipids*, (1981), 16, 377-379.
- [219] Vick, B. A.; Feng, P.; Zimmerman, D. C.: Formation of 12-[¹⁸O]-oxo-*cis*-10,*cis*-15-phytyldienoic acid from 13-[¹⁸O]-hydroperoxylinolenic acid by hydroperoxide cyclase, *Lipids*, (1980), 15, 468-471.
- [220] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: Substrate specificity for the synthesis of cyclic fatty acids by a flaxseed extract, *Plant Physiol.*, (1979), 63, 490-494.
- [221] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: Distribution of a fatty acid cyclase enzyme system in plants, *Plant Physiol.*, (1979), 64, 203-205.
- [222] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1983), 111, 470-477.

- [223] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species, *Plant Physiol.*, (1984), 75, 458-461.
- [224] Vick, B. A.; Zimmerman, D. C.: Characterization of 12-oxo-phytodienoic acid reductase in corn. The jasmonic acid pathway, *Plant Physiol.*, (1986), 80, 202-205.
- [225] Mueller, M. J.: Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis, *Physiol. Plant.*, (1997), 100, 653-663.
- [226] Creelman, R. A.; Mullet, J. E.: Biosynthesis and action of jasmonates in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (1997), 48, 355-381.
- [227] Parthier, G. Sembdner, B.: The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (1993), 44, 569-589.
- [228] Gross, D.; Parthier, B.: Novel natural substances acting in plant growth regulation, *J. Plant Growth Regul.*, (1994), 13, 93-114.
- [229] Creelman, R. A.; Mullet, J. E.: Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression, *Plant Cell*, (1997), 9, 1211-1223.
- [230] Tamari, G.; Borochoy, A.; Atzorn, R.; Weiss, D.: Methyl jasmonate induces pigmentation and flavonoid gene expression in petunia corollas: A possible role in wound response, *Physiol. Plantarum*, (1995), 94, 45-50.
- [231] Gundlach, H.; Müller, M. J.; Kutchan, T. M.; Zenk, M. H.: Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1992), 89, 2389-2393.
- [232] Mason, H. S.; Wald, D. B. de; Creelman, R. A.; Mullet, J. E.: Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyl jasmonate and soluble sugars, *Plant Physiol.*, (1992), 98, 859-867.
- [233] Farmer, E. E.; Ryan, C. A.: Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors, *Plant Cell*, (1992), 4, 129-134.
- [234] Wasternack, C.; Parthier, B.: Jasmonate signalled plant gene expression, *Trends Plant Sci.*, (1997), 2, 302-307.
- [235] Avdiushko, S. A.; Brown, G. C.; Dahlman, D. L.; Hildebrand, D. F.: Methyl jasmonate exposure induces insect resistance in cabbage and tobacco, *Environ. Entomol.*, (1997), 26, 642-654.

- [236] Avdiushko, S.; Croft, K. P. C.; Brown, G. C.; Jackson, D. M.; Hamilton-Kemp, T. R.; Hildebrand, D.: Effect of volatile methyl jasmonate on the oxylipin pathway in tobacco, cucumber, and arabidopsis, *Plant Physiol.*, (1995), 109, 1227-1230.
- [237] Dittrich, H.; Kutchan, T. M.; Zenk, M. H.: The jasmonate precursor, 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum crispum* cell cultures, *FEBS Lett.*, (1992), 309, 33-36.
- [238] Bleichert, S.; Brodschelm, W.; Hölder, S.; Kammerer, L.; Kutchan, T. M.; Xia, Z.-Q.; Zenk, M. H.: The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995), 92, 4099-4105.
- [239] Parchmann, S.; Gundlach, H.; Mueller, M. J.: Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures, *Plant Physiol.*, (1997), 115, 1057-1064.
- [240] Kato, T.; Yamaguchi, Y.; Namai, T.; Hirukawa, T.: Oxygenated fatty acids with anti-rice blast fungus activity in rice plants, *Biosci. Biotech. Biochem.*, (1993), 57, 283-287.
- [241] Kato, T.; Yamaguchi, Y.; Hirano, T.; Yokohama, T.; Uyehara, T.; Namai, T.; Yamanaka, S.; Harada, N.: Unsaturated hydroxy fatty acids, the self defensive substances in rice plant against rice blast disease, *Chem. Lett.*, (1984), 409-412.
- [242] Kato, T.; Yamaguchi, Y.; Abe, N.; Uyehara, T.; Namai, T.; Kodama, M.; Shiobara, Y.: Structure and synthesis of unsaturated trihydroxy C₁₈ fatty acids in rice plant suffering from rice blast disease, *Tetrahedron Lett.*, (1985), 26, 2357-2360.
- [243] Kato, T.; Yamaguchi, Y.; Ohnuma, S.; Uyehara, T.; Namai, T.; Kodama, M.; Shiobara, Y.: Structural elucidation of 11-hydroxy-12,13-epoxyoctadeca-(9Z,15Z)-dienoic acids from rice plants suffering from rice blast disease, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1986), 743-744.
- [244] Blee, E.; Schuber, F.: Biosynthesis of cutin monomers: involvement of a lipoxygenase/peroxygenase pathway, *Plant J.*, (1993), 4, 113-123.
- [245] Schauenstein, E.; Esterbauer, H.; Zollner, H.: *Aldehydes in Biological Systems - Their Natural Occurrence and Biological Activities*, Pion, London, (1977).
- [246] Walker, M. A.; Roberts, D. R.; Dumbroff, E. B.: Convenient apparatus for methylating small samples with diazomethane, *J. Chromatogr.*, (1982), 241, 390-391.

-
- [247] Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, (1976), 72, 248-254.
- [248] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, (1951), 193, 265-275.
- [249] Peterson, G. L.: Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Anal. Biochem.*, (1979), 100, 201-220.

6. Anhang

Massenspektren von 2E- und 3Z-Hexenal:

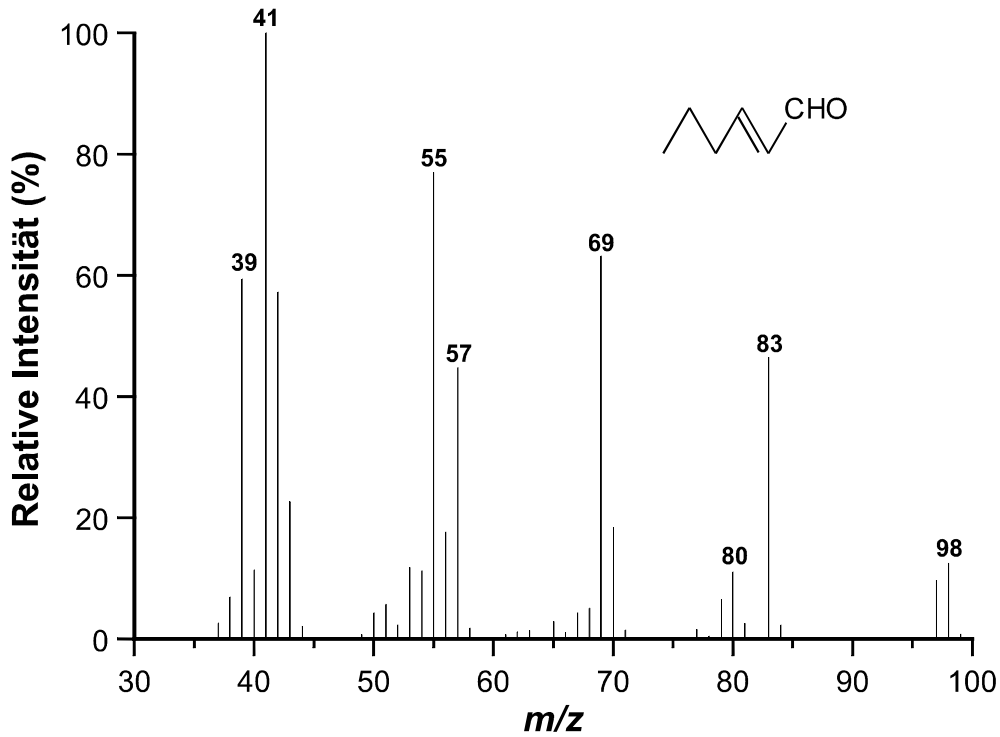


Abb. 6-1: GC-Massenspektrum (EI) von 2E-Hexenal.

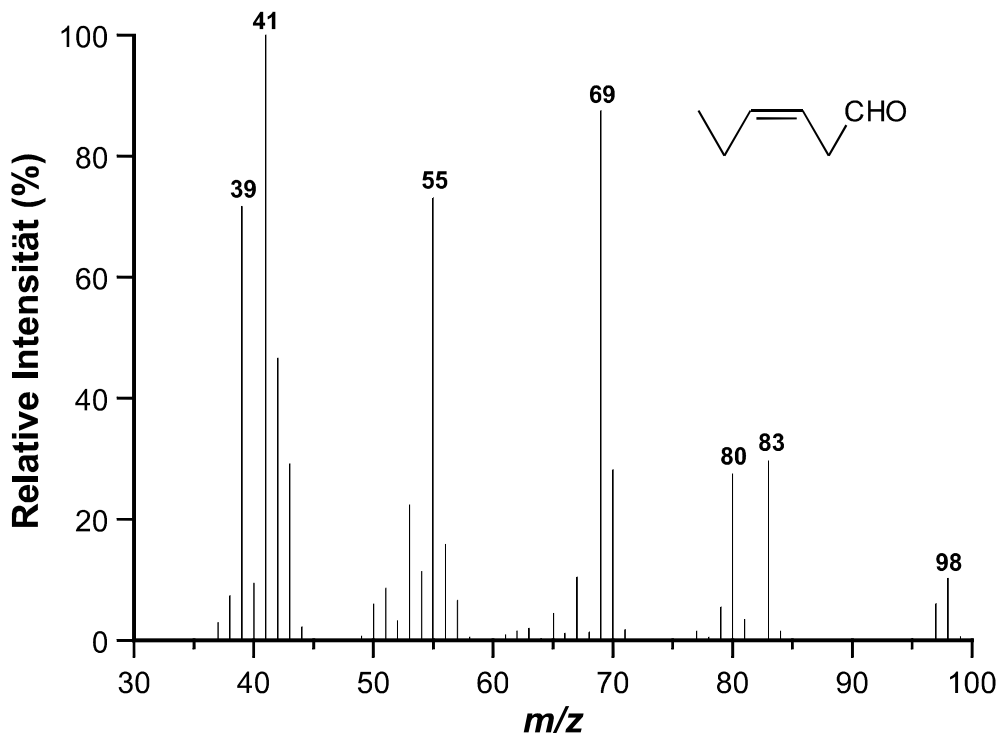


Abb. 6-2: GC-Massenspektrum (EI) von 3Z-Hexenal.

