NN 8201 № 505

BIJLAGE

Proefschrift J.P. Roozen

18/2/1972

BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN

NN08201.505

UEBER DIE STABILITÄT ADSORBIERTER ENZYME IN WASSERARMEN SYSTEMEN

J.P. Roozen & W. Pilnik

I. Die Stabilität von Peroxydase bei 25°C.
Lebensm.-Wiss.u.Technol., 3 , 37 - 40 (1970).

II. Der Einfluss von pH-Verschiebungen auf die Stabilität von Peroxydase bei 2°C.
Lebensm.-Wiss.u.Technol., 4 , 24 - 26 (1971).

III. Der Effekt von Elektronenbestrahlung auf die Stabilität von Peroxydase.
Lebensm.-Wiss.u.Technol., 4 , 93 - 96 (1971).

IV. Der Effekt von Lagerung und Elektronenbestrahlung auf die Stabilität von Pektinmethylesterase.
Lebensm.-Wiss.u.Technol., 4 , 158-162 (1971).

V. Der Effekt von Lagerung und Elektronenbestrahlung auf die Stabilität von alkalischer Phosphatase.
Lebensm.-Wiss.u.Technol., 4 , 196-200 (1971).

VI. Möglichkeiten zur Inaktivierung von Enzymen in getrockneten Lebensmitteln durch Bestrahlung. Betrachtungen im Lichte der Literatur und eigener Untersuchungen.
Lebensm.-Wiss.u.Technol., im Druck (1972).

Über die Stabilität adsorbierter Enzyme in wasserarmen Systemen
I. Die Stabilität von Peroxydase bei 25 °C

J. P. Roozen und W. Pilnik

Landwirtschaftliche Hochschule, Abteilung für Lebensmittelwissenschaft, Wageningen (Niederlande)
(Eingegangen 7. November 1969, lwt 48)

Wäßrige Lösungen von Peroxydase und Carboxymethylcellulose (CMC), resp. lösliche Stärke, resp. Polyvinylpyrrolidon (PVP) wurden gefriergetrocknet. Die so erhaltenen Modellsysteme waren vollständig wasserlöslich. Sie wurden über gesättigten Salzlösungen bei verschiedenen Wasseraktivitäten inkubiert. Die Stabilität der Peroxydase wurde sowohl vom hochpolymeren Träger wie auch von der relativen Luftfeuchtigkeit (r.L.) beeinflußt.

Einleitung

Die Aktivität von Enzymen in wasserarmen Lebensmitteln hat das Interesse vieler Untersucher erweckt [vgl. Übersichtsreferat ACKER (1)]. Bei diesen Arbeiten (2, 3, 4) zeigte es sich, daß Enzymbestimmungen in Lebensmitteln nicht leicht durchführbar sind. Man arbeitet deshalb mit Modellen, welche ein bestimmtes Enzym und sein Substrat enthalten; Veränderungen des Substrates können dann als Funktion der Zeit analytisch erfaßt werden. Mit dieser Technik wurde festgestellt, daß die Prozesse bis zu einem bestimmten Niveau ablaufen, dessen Höhe von der relativen Luftfeuchtigkeit (r.L.) abhängig ist (2). Die Schlußfolgerung hieraus ist (2), daß enzymatische Reaktionen lediglich in dem kondensierten Wasser in den Kapillaren möglich sind. Das Niveau, auf welchem die Reaktion zum Stillstand kommt, ist direkt proportional mit der im Kondenswasser gelösten Substratmenge. Dieser Mechanismus setzt stillschweigend voraus, daß die Aktivität der Enzyme selbst sich nicht verändert (ref. 1, p. 313).
Unsere eigenen Modellsysteme sind vollständig und «instant» in Wasser löslich. Dies gestattet uns, echte Aktivitätsbestimmungen nach verschiedenen Lagerzeiten und Lagerbedingungen durchzuführen und damit vor allem die Aktivitätsveränderungen der Enzyme selbst zu beobachten.

Materialien und Methoden

Modelle. Enzymlösung: 100 mg Meerrettich-Peroxydase (E.C. 1.11.1.7; Worthington Biochemical Corporation) werden in 100 ml 0,01 M Sörensen Phosphatpuffer pH 7 gelöst. Matrices: CMC Edifas B 10 I.C.I., lösliche Stärke Fluka und PVP K 25 Fluka. Es werden immer 200 ml einer 2%igen Polymerlösung ohne weitere pH-Adjustierung mit 3,5 ml der Peroxydaselösung gemischt und gefriergetrocknet. Dabei gibt die folgende Methode die besten Resultate: Auf dem Boden von 230 mm Durchmesser Petrischalen werden 100 ml destilliertes Wasser gefroren. Auf diese Eisschicht wird die Modellösung gegossen und ebenfalls gefroren. Anschließend erfolgt dann die Gefriertrocknung in einem Leybold G-07-Apparat, welche rund 45 Stunden dauert. Der trockene «Kuchen» wird in einem Braunmixer zu einem homogenen Gemisch gemahlen.

Inkubation. Die gemahlene Modellsubstanz wird in 40 × 40 mm Polyäthylen-Sachets verpackt, die die folgenden Vorteile aufweisen: Verschweißbar, schneidbar, flexibel und genügend wasserdampfdicht. Um die Sachets vor dem Umkippen und Ausleeren zu schützen, werden sie aufrecht stehend in kleine Konfitürengläser gesteckt und so in einem Exsikkator über P_2O_5 6 Tage lang nachgetrocknet. Bei den Lagerversuchen bei verschiedenen r.L. hat man es dann ausschließlich mit Wasseradsorption zu tun. Die r.L. werden mittels gesättigter Salzlösungen eingestellt (5), wobei 5 Meßpunkte über das Gebiet $10\% < \varphi < 75\%$ so gut wie möglich verteilt werden (Tab. 1).

Wasserbestimmung. Als Grundlage dient die Karl-Fischer-Methode, wie sie von DE MOOR (6) auf Milchpulver zugepaßt wurde. Die kleinen Mengen, die analysiert werden müssen, bedingen weitere Abänderungen: die Sachets werden nach der Entnahme aus dem Exsikkator sofort verschweißt und gewogen. Sie werden dann innerhalb eines Titriergefäßes der KF-Apparatur (Metrohm AG, Herisau) aufgeschnitten; das Gefäß wird so schnell wie möglich angeschlossen und mit 10 ml absolutem Methanol unter Rühren und Durchleiten von getrocknetem N_2 gefüllt. Die Titration erfolgt nach 15minütiger Extraktion (stabilized KF reagent, May und Baker). Als Urtitersubstanz dient Natriumtartrat p.a. von Merck.

Enzymaktivität. Nach der Entnahme aus einem Exsikkator werden die Sachets verschweißt und gewogen. Als Trockengewicht gilt dieses Gewicht nach Abzug der Tara und der adsorbierten Feuchtigkeit, welche wegen der schnellen Wasseraufnahme dieser Systeme aus den Werten der Tab. 1 entnom-

Tabelle 1 Wassergehalte in % des Gesamtgewichtes der gefriergetrockneten Modellsysteme nach 9 Tagen Inkubation bei 25 °C

Gesättigte Salzlösungen	% r.L	% Wasser CMC	lösliche Stärke	PVP
$LiCl . H_2O$	11,3	4	4,5	5,5
$C_2H_5COOK . 1{,}5H_2O$	22,2	7	5,5	7,5
$K_2CO_3 . 2H_2O$	43,7	11	8	13,5
NH_4NO_3	62,5	17	10,5	20
NaCl	75,1	24,5	12,5	25,5

men werden kann. Der Inhalt der Sachets wird dann in destilliertem Wasser aufgelöst (3–5 mg Trockengewicht per ml). Es zeigte sich, daß die Aktivität in den ersten Stunden nach der Lösung Schwankungen unterworfen war, wie dies übrigens auch von WELIKY (7) beschrieben wurde. Wir haben daher alle Messungen nach Stehen über Nacht bei 5 °C durchgeführt und die Aktivität auch noch nach längerem Stehen überprüft. Die Aktivität wird nach CHANCE und MAEHLY (8) bestimmt (Farbentwicklung mit H_2O_2 und Guajacol), wobei wir für unsere 2 cm Küvetten das Dreifache der angegebenen Volumina nehmen, mit entsprechender Korrektur bei der Berechnung. Die Messungen werden mit einem Zeiss Spektrofotometer PMQ II gemacht, der mit einem auf 20 °C thermostatisiertem Küvettenhalter mit Küvettenrührwerk und mit einem Servogor Kompensationsschreiber (Goertz) versehen ist. Die Steigung der zu Beginn der Reaktion linear verlaufenden Extinktionszeitkurve ist direkt proportional der Enzymaktivität. Die folgenden Chemikalien wurden ohne weitere Säuberung für die Aktivitätsbestimmungen benützt: Phosphate p.a. Merck, Perhydrol Merck, Guajacol pract. Eastman Kodak.

Resultate

Die Wasseraufnahme des gefriergetrockneten Materiales zeigte sich in Vorversuchen abhängig von der Struktur desselben, welche wiederum mit der Konzentration der Polymeren variiert. Darum wurden immer 2%ige Lösungen auf oben beschriebene Weise getrocknet. Die Resultate sind aus **Tab. 1** ersichtlich. Bei 75% r.L. waren nach 24 Stunden bei allen drei Polymeren auch äußerlich Veränderungen festzustellen. Die CMC-Teilchen klebten aneinander, die Stärke wurde ein harter Block und das PVP begann zu verfließen (nach 9 Tagen sogar bereits bei 62,5% r.L.).

Aktivitätsveränderungen

CMC-Peroxydase: Nach der Inkubationszeit war die Aktivität bei 75% r.L. am höchsten. Sie wurde deshalb mit 100 angenommen und alle anderen Aktivitäten sind in % hiervon ausgedrückt. Da wir den Einfluß der einzelnen Behandlungsstufen noch nicht bestimmt haben, scheint uns dies die besten Vergleichsmöglichkeiten zu geben (die 100% bei 75% r.L. entsprechen etwa der Hälfte der eingewogenen Aktivität). Wie aus **Abb. 1** ersichtlich ist, geht die Kurve durch ein Minimum bei 43,7% r.L., welches bei längerer Lagerzeit noch verstärkt wird.

CMC-Peroxydase-Guajacol: Hierfür wurden 1,5 ml Guajacol zu 200 ml 2% CMC-Lösung zugegeben und weiter wie für das CMC-Peroxydase-Modell vorgegangen. Die Resultate sind in **Abb. 2** dargestellt und zeigen eine Verbesserung der Stabilität des Enzymes durch den Guajacol-Zusatz. Ein deutliches Minimum bei 62,5% r.L. nach 13 Tagen Lagerzeit verschwindet nach 42 Tagen zu Gunsten einer U-förmigen Kurve mit einem flachen Minimum bei 43,7% r.L. Die große Stabilität bei den Extrem-r.L.-Werten bleibt erhalten.

Bei beiden CMC-Modellen war nach Auflösen und Aufbewahren bei 5 °C während 6 Tagen eine geringe Abnahme der Enzymaktivität festzustellen. Dies ist ein Hinweis auf irreversible Veränderungen während des Lagerns im trockenen System.

Stärke-Peroxydase: In diesem System ist ein deutliches Maximum der Enzymstabilität bei 62,5% r.L. festzustellen (**Abb. 3**). Wie bei CMC liegt auch dieses Maximum bei etwa der Hälfte der eingewogenen Aktivität. Bei 22,2 und 43,7% r.L. steigt die Aktivität mit der Lagerzeit. Dies ist als Aktivierung des Enzymes durch Wasseraufnahme zu deuten, eine Aktivierung, die bei 62,5% r.L. besonders schnell verläuft, während bei noch höherer Wasseraktivität das Enzym inaktiviert wird. Dieses

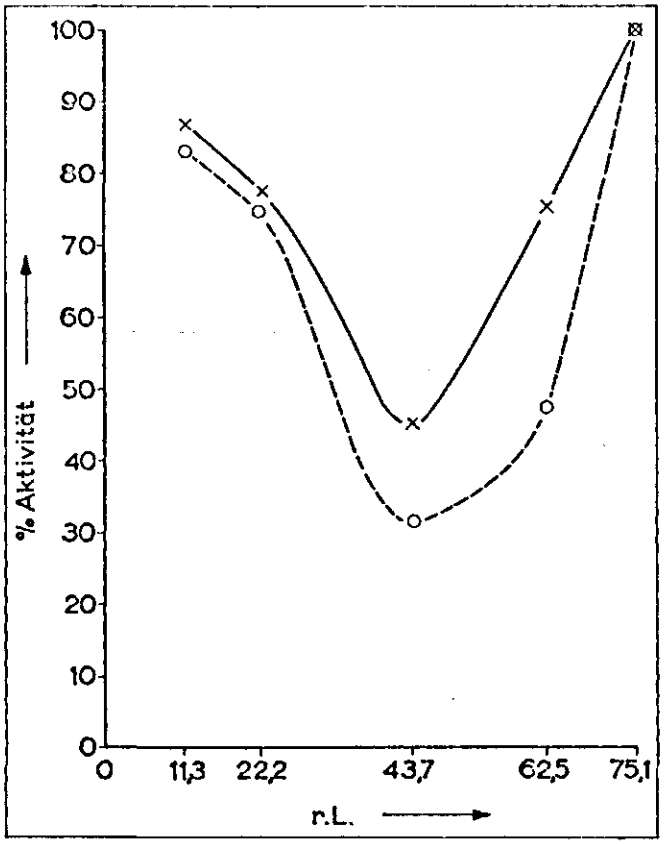
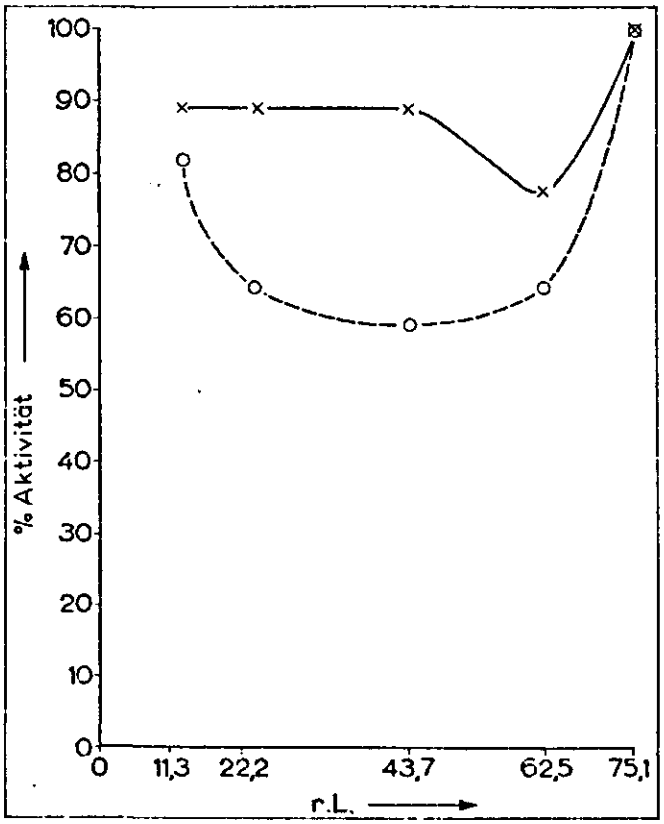


Abb. 1 Aktivität von Peroxydase auf CMC nach 6 Tagen (×——×) und nach 13 Tagen (○---○) in verschiedenen r.L.

Abb. 2 Aktivität von Peroxydase auf CMC-Guajacol nach 13 Tagen (×——×) und nach 42 Tagen (○---○) in verschiedenen r.L.



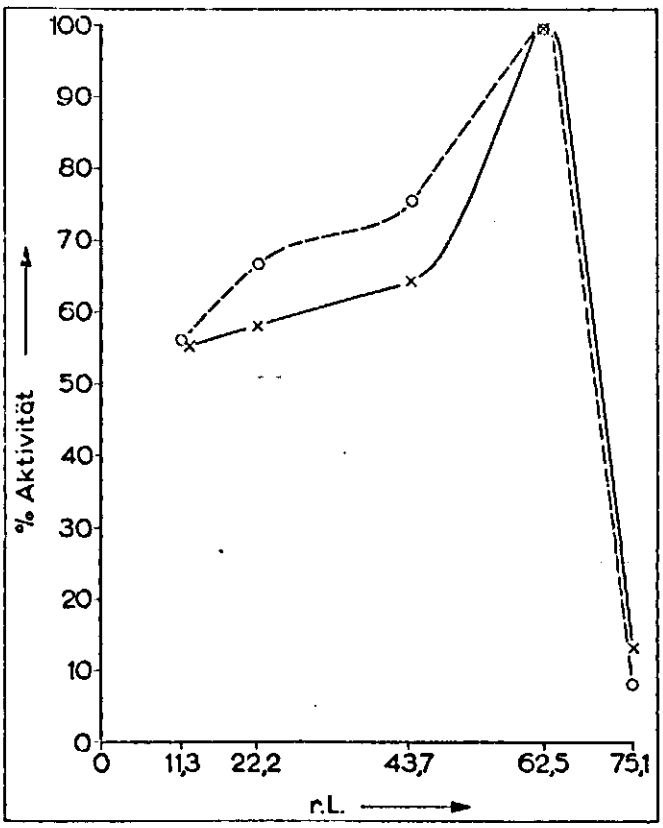


Abb. 3 Aktivität von Peroxydase auf Stärke nach 6 Tagen (×——×) und nach 15 Tagen (○---○) in verschiedenen r.L.

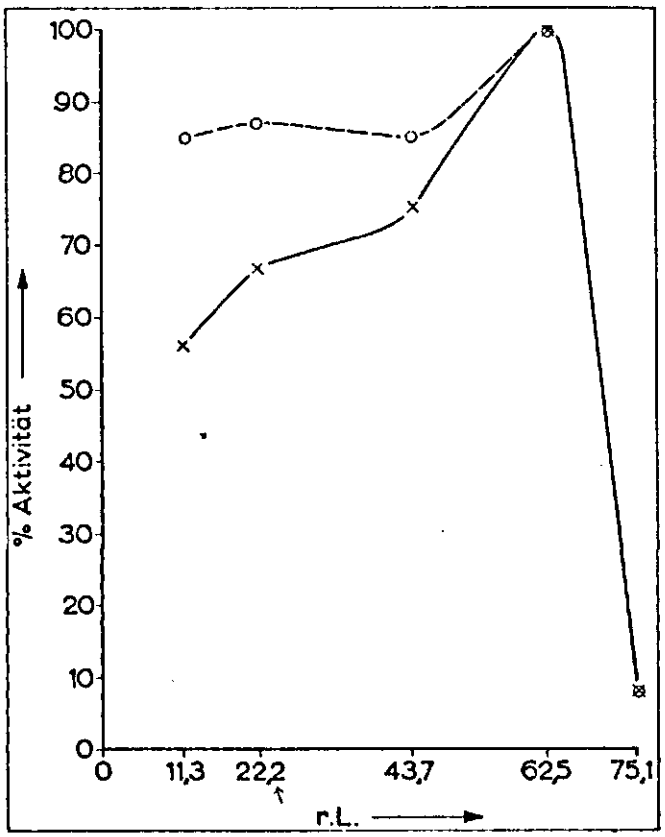
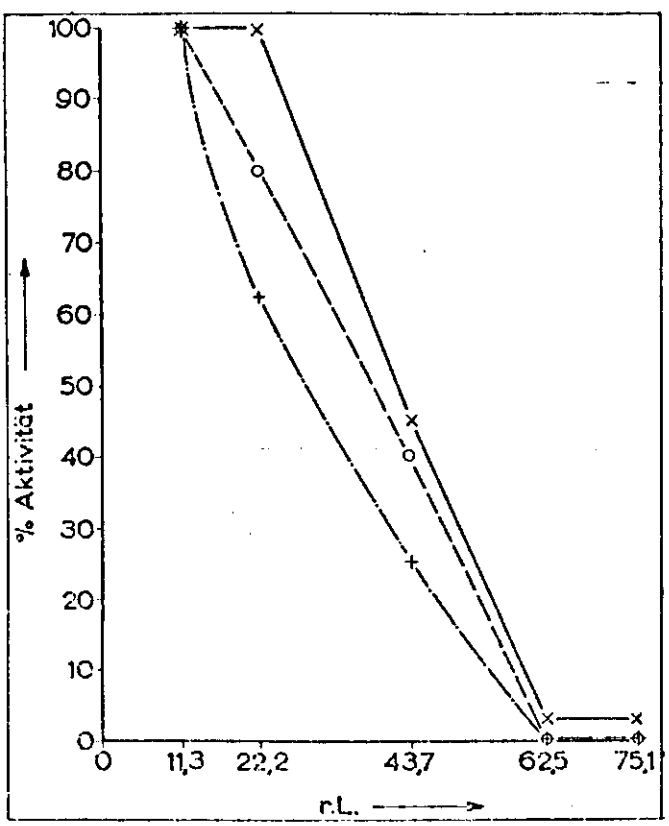


Abb. 4 Aktivität von Peroxydase nach 1 Tag (×——×) und nach 6 Tagen (○---○) bei 5 °C nach Auflösen des Systemes Stärke-Peroxydase.

Aktivierungsphänomen zeigte sich auch im Verhalten nach Auflösen und 6tägigem Aufbewahren bei 5 °C (Abb. 4). Bei noch längerem Stehen nahm dann die Aktivität in sämtlichen Lösungen ab. Im Gegensatz zu den CMC-Modellen kann man daher beim Stärke-Modell für einen Teilbereich der r.L. von reversiblen Veränderungen sprechen.

PVP-Peroxydase: Bereits nach einem Tag Inkubation war eine steile Abnahme der Aktivität mit zunehmender r.L. festzustellen (Abb. 5). Ab r.L. > 60% war überhaupt keine Aktivität mehr zu messen. Bei längerer Inkubation nahm auch die Aktivität der trockeneren Muster ab. Am stabilsten scheint das Enzym bei 11,3% r.L. zu sein, diese Aktivität entspricht etwa 25% der Einwage. Nach Auflösen und Stehenlassen bei 5 °C nahm die Aktivität sämtlicher Lösungen noch weiter ab. Es handelt sich also um eine irreversible Inaktivierung.

Abb. 5 Aktivität von Peroxydase auf PVP nach 1 Tag (×——×), 2 Tagen (○---○) und 9 Tagen (+—·—+) in verschiedenen r.L.



Diskussion

Die Verwendung von schnell und vollständig wasserlöslichen Systemen ermöglichte es, echte Enzym-Aktivitätsbestimmungen auszuführen und dadurch auch Aktivitätsveränderungen zu bestimmen. Diese Aktivitätsveränderungen erwiesen sich als irreversible in den Systemen CMC-Peroxydase und PVP-Peroxydase. Im System Stärke-Peroxydase verursachte die Trocknung eine Aktivitätsverminderung die zum Teile durch Rehydratation wieder aufgehoben wurde.

ACKER und seine Gruppe (9) stellten in ihren schönen Versuchen fest, daß in Substrat-Enzym-Gemischen je nach r.L. verschiedene Umsatzniveaus erreicht werden, die aber alle auf das (höchste) Niveau bei r.L. = 70% gebracht werden können, wenn die Modelle nach Inkubation bei niedriger r.L. auf eine höhere r.L. gebracht werden. Daraus wird zu Recht die Möglichkeit einer vollständigen Inaktivierung ausgeschlossen. Allerdings zeigt sich in einigen Fällen, daß bei der Rehydratation bei 70% r.L. nach Vorinkubation in trockener Atmosphäre die Reaktionsgeschwindigkeit je nach Dauer der Vorinkubation verschieden ausfällt [vgl. z. B. Abb. 1-3 bei ACKER und KAISER

(2)]. Dies ließe sich auf eine teilsweise Inaktivierung während der Vorlagerung, wie wir sie hier beschrieben haben, zurückführen. Beim System Cellulose/Phenoloxydase/Brenzcatechin [Abb. 1; ACKER und HUBER (10)] wurde auch durch Nachinkubation bei 70% r.L. der Umsatzgrad trotz anfänglich steilen Anstieges nicht mehr erreicht, der bei Direktinkubation bei 70% r.L. gemessen wurde. Dies wird nun von den Autoren durch «partielle Inaktivierung» erklärt. In diesem Fall fragen wir uns allerdings, ob ein Stehenbleiben der Reaktion bei verschiedenen Niveaus mit Aktivitätsveränderungen erklärt werden darf. Eine starke Verlangsamung der Maltosebildung bei 75% r.L. fanden KIERMEIER und CODURO (11) im Modell Stärke-Diastase. Dies deckt sich mit dem starken Aktivitätsabfall, den wir im System Stärke-Peroxydase bei dieser r.L. feststellen konnten.

Die großen Unterschiede im Verhalten der hier vorläufig untersuchten Modelle zeigen, daß hieraus Voraussagen für das Verhalten der kompliziert zusammengestellten natürlichen Systeme (wasserarme Lebensmittel) kaum gemacht werden können.

Literatur

1 ACKER, L., Adv. Fd. Res., *11*, 263 (1962).
2 ACKER, L. und KAISER, H., Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., *110*, 349 (1959).
3 ACKER, L. und KAISER, H., Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch., *115*, 203 (1961).
4 MATHESON, N. A., J. Sci. Fd. Agric., *13*, 248 (1962).
5 YOUNG, J. F., J. Appl. Chem., *17*, 241 (1967).
6 DE MOOR, H., DE CORDIER, J. und HENDRIKX, H., Med. Rijksfac. Landbouwwetenschap Gent, *32*, 49 (1967).
7 WELIKY, N., BROWN, F. S. und DALE, E. C., Arch. Biochem. Biophys., *131*, *1* (1969).
8 CHANCE, B. und MAEHLY, A. C., Methods Enzymol., *2*, 764 (1955).
9 ACKER, L., Nahrung, *12*, 557 (1968).
10 ACKER, L. und HUBER, L., Lebensm.-Wiss. u. Technol., *2*, 82 (1969).
11 KIERMEIER, F. und CODURO, E., Biochem. Z., *325*, 280 (1954).

Über die Stabilität adsorbierter Enzyme in wasserarmen Systemen

II. Der Einfluss von pH-Verschiebungen auf die Stabilität von Peroxidase bei 2°C

J.P. Roozen und W. Pilnik

Landwirtschaftliche Hochschule, Abteilung für Lebensmittelwissenschaft, Wageningen (Niederlande)

(Eingegangen 22. Juli 1970, lwt 72)

Die Stabilität der Modellsysteme Peroxydase/CMC, Peroxydase/Stärke und Peroxydase/PVP hängt neben Temperatur und r.L. stark vom pH ab. Temperatur und r.L. können leicht auf gewünschte Werte eingestellt und konstant gehalten werden. Um grössere pH-Verschiebungen zu verhindern, muss der Zutritt von Kohlensäure ausgeschlossen werden, die Inkubation über Säuren ist zu vermeiden und wenn möglich müssen die Systeme gepuffert werden.

Einleitung

Die niedrigen Restaktivitäten von Peroxydase nach Inkubation mit Carboxymethylcellulose (CMC), löslicher Stärke und Polyvinylpyrrolidon (PVP), über welche wir in unserer ersten Mitteilung berichteten (1), haben uns veranlasst, auch anderen Faktoren als der relativen Luftfeuchtigkeit (r.L.) nachzugehen. Insbesondere sind pH-Veränderungen beim Gefrieren oder/und Gefriertrocknen nicht auszuschliessen. HEISS und SCHACHINGER (2) berichteten über pH-Senkung beim Gefrierkonzentrieren von Apfelsaft und KALLISTRATOS und SENGBUSCH (3) beschrieben den Verlust organischer Stoffe beim Gefriertrocknen (z. B. Oxalsäure bei Spinat). Obwohl für Peroxydase-Lösungen eine pH-Stabilität von 3,5 bis 12 beschrieben ist (4), wollten wir doch dem Einfluss der H^+-Ionenkonzentration auf die Stabilität der Peroxydase in wasserarmen Systemen nachgehen.

Materialien und Methoden

Eine ausführliche Beschreibung findet man in unserer I. Mitteilung (1). Es wurden immer 100 mg Meerrettich-Peroxydase (E.C.1.11.1.7.; Worthington Biochemical Corporation) in 100 ml 0,01 M Sörensen Phosphatpuffer (pH 7) aufgelöst und von dieser Lösung 2 ml zusammen mit 100 ml einer 2 %-igen Polymerlösung (CMC Edifas B 10 ICI, lösliche Stärke Fluka, PVP K 25 Fluka) gefriergetrocknet. Um gepufferte Systeme zu erhalten, wurde den Mischungen vor dem Gefriertrocknen 120 mg Veronal-Azetat (Oxoid) zugefügt und mit 0,1 N NaOH auf pH 8 eingestellt. Bei den Mischungen ohne Veronal-Azetat Zusatz wurde mit 0,1 N NaOH auf pH 7 eingestellt. Die ursprünglichen pH-Werte der Mischungen sind 6 für CMC, 3,6 für die lösliche Stärke von 4,1 für PVP. Um beim Aufheben des Vakuums und bei der weiteren Verarbeitung des Trockengutes jegliche CO_2-Aufnahme zu verhüten, wurden in die Leitungen des Leybold G-07 Gefriertrockners Natronkalk-Adsorber eingeschaltet. Gemahlen wurde in N_2-Atmosphäre in einem unter N_2-Druck stehenden Impfkasten und inkubiert wurde im Vakuum. Wie früher beschrieben (1) wurden die Proben in Polyäthylen-Sachets zuerst über P_2O_5 nachgetrocknet und dann zwei Wochen bei verschiedenen relativen Luftfeuchtigkeiten (r.L.) bewahrt. Mit P_2O_5 und gesättigten Salzlösungen (5) wurden sieben Messpunkte im Gebiet 0 %< r.L. <75 % eingestellt (Tab. 1). Da nach unserer Erfahrung die Restaktivitäten nach Inkubation bei 2 °C höher ausfallen als bei 25 °C und wir für unser weiteres Arbeitsprogramm auf hohe Restaktivitäten angewiesen sind, wurde im Gegensatz zu früher nun bei 2 °C inkubiert. Die Bestimmungen der Wassergehalte (Karl Fischer) und der Enzymaktivität (H_2O_2 + Guajacol) wurden wie beschrieben (1) ausgeführt.

Resultate

Wassergehalt

In Tab. 1 sind die Resultate der Wassergehaltsbestimmungen nach 14-tägiger Inkubation bei verschiedenen r.L. und 2 °C wiedergegeben. Die Unterschiede zwischen den gepufferten und nicht gepufferten Systemen sind mit dem Salzgehalt der ersten (6 % der Trockensubstanz) zu erklären.

pH-Veränderungen

Die ungepufferten, aber auf pH 7 neutralisierten Systeme weisen bei unserer normalen Arbeitsweise nach dem Gefriertrocknen alle ein tieferes pH auf. Bei Einhalten der beschriebenen Vorsichtsmassnahmen, um Luft-CO_2 auszuschliessen, gelingt es, das pH von CMC und Stärke bei pH 7 zu halten; das pH von PVP jedoch sinkt auf 5 und tiefer. Bei nochmaligem Gefriertrocknen erfolgt keine pH-Veränderung mehr. Wir haben daher für diese Versuche ausschliesslich vorgefriergetrocknetes PVP gebraucht. Trotzdem mussten wir feststellen, dass das ungepufferte PVP-System weitere pH-Abnahmen bis zu pH<3 aufwies und zwar beim Nachtrocknen über P_2O_5, gefolgt von La-

Tab. 1 Wassergehalte in % des Gesamtgewichtes der gefriergetrockneten Modellsysteme nach 14 Tagen Inkubation über P_2O_5 und gesättigten Salzlösungen bei 2 °C.

		% Wasser					
		CMC		Lösliche Stärke		PVP	
Salze	% r.L	gepuffert	nicht gepuffert	gepuffert	nicht gepuffert	gepuffert	nicht gepuffert
P_2O_5	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$NaOH \cdot H_2O$	7	4,5	5,5	3,5	3,5	4,5	4
$LiCl \cdot 2H_2O$	14,1	7	7,5	4,5	5	7	6,5
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	33,9	11,5	12,5	7	8,5	13	13
$NaI \cdot 2H_2O$	46,6	15	15,5	8	10	16,5	17
$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	59,5	20,5	19,5	10	12	21	21
NaCl	75,6	26,5	26	11	14,5	25	26,5

gern über 60 % H_2SO_4 techn. (r.L. = 14 %). Wie sehr man auf solche Phänomene aufpassen muss, zeigt ein einfacher Versuch mit verdünnter Natronlauge. Nach einer Woche im leeren Exsikkator sank das pH von 10 auf 8, über H_2SO_4 conc. p.a. Merck auf 7 und über H_2SO_4 conc. techn. auf 3,5. Wir vermieden daher den Gebrauch von Schwefelsäure zur Einstellung von relativen Luftfeuchtigkeiten und werden in Zukunft zur Nachtrocknung auch P_2O_5 durch Silicagel ersetzen.

Aktivitätsveränderungen

CMC-Peroxydase. Nach dem Gefriertrocknen hat das gepufferte Präparat noch 75 % und das nicht gepufferte Präparat noch 65 % der eingewogenen Aktivität. Als Funktion der r.L. ergeben sich parallel laufende Minimumskurven (Abb. 1). Beim Vergleich mit den Kurven unserer ersten Mitteilung (1) ist zu beachten, dass die Prozentzahlen sich nun auf die eingewogene Aktivität beziehen, was aber den Charakter der Kurve nicht verändert. Durch Neutralisation

Abb. 1 Aktivität von Peroxydase auf CMC bei pH 7 (nicht gepuffert; 0 – – – 0) und bei pH 8 (Veronal-Azetat; x —— x) nach 14 Tagen in verschiedenen r.L.

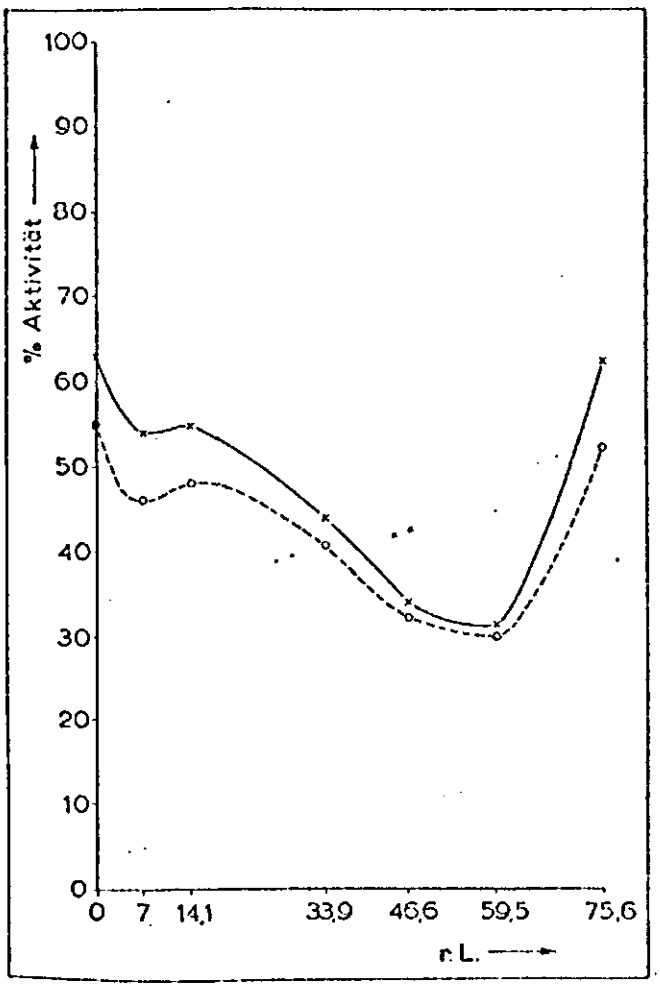
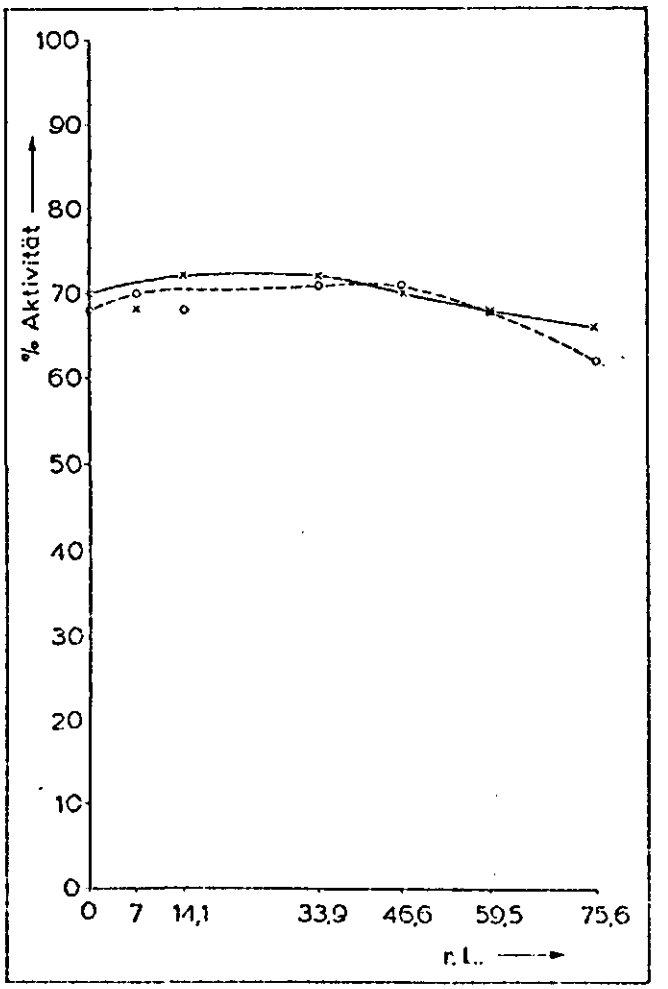


Abb. 2 Aktivität von Peroxydase auf Stärke bei pH 7 (nicht gepuffert; 0 – – – 0) und bei pH 8 (Veronal-Azetat; x —— x) nach 14 Tagen in verschiedenen r.L.



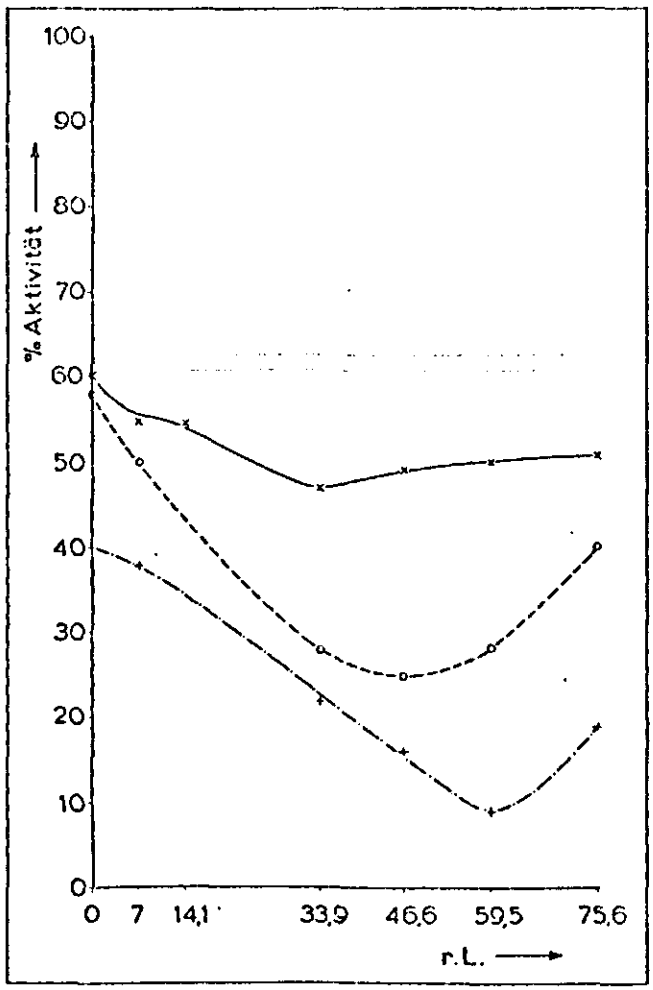


Abb. 3 Aktivität von Peroxydase auf PVP bei pH 6 (nicht gepuffert; 0 – – – 0), bei pH 5,4 (nicht gepuffert; + –.– +) und bei pH 8 (Veronal-Azetat; x ——— x) nach 14 Tagen in verschiedenen r.L.

und Inkubation bei tieferer Temperatur hat sich das Stabilitätsminimum etwas in Richtung höherer r.L. verschoben. Nach Auflösen und Aufbewahren bei 5 °C während einer Woche war nur eine geringe Abnahme der Aktivität feststellbar.

Stärke-Peroxydase. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, liegen die Restaktivitäten aller Proben auf einer flachen Kurve bei ca. 70 % der eingewogenen Aktivität (80 % nach dem Gefriertrocknen). Das Aktivierungsphänomen (1) bei höheren Wassergehalten konnte bei diesen pH-stabilen Systemen nicht mehr festgestellt werden, wobei ebenfalls berücksichtigt werden muss, dass nun alle Punkte von Anfang an auf einem bedeutend höheren Aktivitätsniveau liegen. Nach Auflösen und Aufbewahren bei 5 °C während einer Woche blieben die Aktivitäten unverändert.

PVP-Peroxydase. Sowohl die gepufferten wie auch die nicht gepufferten Lösungen hatten nach dem Gefriertrocknen noch 75 % Restaktivität. Bei Inkubation bei verschiedenen r.L. erwies sich das gepufferte System als stabiler, in Bezug auf pH wie in Bezug auf die Aktivität. Abb. 3 zeigt auch, dass die pH-Veränderungen der nicht gepufferten Modelle trotz der gebrauchten Vorsichtsmassregeln nicht gut reproduzierbar sind. Die früher (1) bemerkte vollständige Inaktivierung ist offensichtlich auf die sich damals einstellenden tiefen pH-Werte zurückzuführen. Nach Auflösen und Aufbewahren bei 5 °C wurde bei allen Proben nach einer Woche ca. 10 % Aktivitätsverlust festgestellt.

Diskussion

Die Zufügung von Veronal-Azetat zu unseren Modellen beeinflusst deren Feuchtigkeitsaufnahme. Einen ähnlichen Effekt fanden ACKER und HUBER (6) bei der Zugabe von Puffersalzen zu Oxydase-Cellulose-Glucose Präparaten und ACKER und KAISER (7) bei der Zugabe von Kochsalz zu Gerstenmalzmehl. Die sprunghafte Veränderung der Adsorptionsisothermen, welche von den letztgenannten Autoren beobachtet wurde, schreiben wir den starken Veränderungen der Oberflächenverhältnisse in den Systemen zu. Unsere eigenen Modelle sind gefriergetrocknete Lösungen, sodass sich die Sorptionsthermen nur geringfügig additiv verändern, in Übereinstimmung mit den Resorptionsisothermen von ACKER und KAISER (7); (Abb. 10).

Dem pH-Effekt ist offensichtlich besondere Bedeutung zuzumessen; die grossen Unterschiede im Aktivitätsverlust bei den PVP-Modellen und die relative Stabilität der CMC- und Stärke Modelle widerspiegeln die entsprechende Anfälligkeit zur pH-Abnahme (das benützte PVP enthält offensichtlich flüchtige basische Gruppen).

Literatur

1 ROOZEN, J.P. und PILNIK, W., Lebensm.-Wiss. u. Technol., 3, 37 (1970)
2 HEISS, R. und SCHACHINGER, L., Kältetechnik, *1*, 216 (1949)
3 KALLISTRATOS, G. und SENGBUSCH, R. von, Z. Lebensm.-unters. u.-Forsch., *126*, 344 (1965)
4 MAEHLY, A.C., Methods in Enzymology, Academic Press, New York, Vol. 2, p. 801, (1955)
5 YOUNG, J.F., J. Appl. Chem., *17*, 241 (1967)
6 ACKER, L. und HUBER, L., Lebensm.-Wiss. und Technol., *3*, 33 (1970)
7 ACKER, L. und KAISER, H., Z. Lebensm.-unters. u.-Forsch., *115*, 203 (1961)

Über die Stabilität adsorbierter Enzyme in wasserarmen Systemen
III. Der Effekt von Elektronenbestrahlung auf die Stabilität von Peroxydase

J.P. Roozen und W. Pilnik

Landwirtschaftliche Hochschule, Abteilung für Lebensmittelwissenschaft, Wageningen (Niederlande)
(Eingegangen 19. Oktober 1970, lwt 87)

Die Modellsysteme CMC-Peroxydase, Stärke-Peroxydase und PVP-Peroxydase mit verschiedenen pH-Werten und Feuchtigkeiten wurden bestrahlt. Die Bestrahlungsempfindlichkeit des Enzyms zeigte sich abhängig vom gewählten Polymer, vom pH und vom Wassergehalt. Ein Nacheffekt in den wässrigen Lösungen der Modelle mit Stärke und CMC wirkt nivellierend auf die ursprünglich festgestellten Empfindlichkeiten. Das System Peroxydase-PVP weist keinen Nacheffekt auf.

On the stability of adsorbed enzymes in water deficient systems. III. The effect of irradiation by electrons on the stability of peroxidase.

Models consisting of CMC-Peroxydase, Starch-Peroxydase and PVP-Peroxydase with different humidities and pH-values were irradiated. The radiation sensitivity of the enzyme was seen to depend on the polymer used in the model, the humidity and the pH-value. After solution CMC and Starch showed an after-effect which minimized the original differences in sensitivity. No after-effect was noticed with the model Peroxydase-PVP.

Einleitung

Aus einer Übersicht von AUGENSTINE (1) geht hervor, dass die Bestrahlungsempfindlichkeit eines Enzyms vor allem von der Zusammensetzung des zu bestrahlenden Systems abhängt. BRAAMS et al. (2) haben am Beispiel von Invertase gezeigt, wie deren Bestrahlungsempfindlichkeit in trockenem Zustand beeinflusst wird durch die Zusammensetzung des Mediums, in welchem das Enzym getrocknet wurde. Den Einfluss des Wassergehaltes auf den Bestrahlungseffekt untersuchte WEDEMEYER (3) unter anderem am System Zellulose-Ascorbinsäure, wobei er seine Ausgangshypothese, dass gebundenes Wasser eine wichtige Quelle von Radikalen sei, verwerfen musste, zugunsten der Erkenntnis, dass es für den Bestrahlungsenergietransport wichtig ist. Unsere bereits ausführlich beschriebenen (4, 5) Modellsysteme Peroxydase-CMC (Carboxymethylcellulose), Peroxydase-Stärke und Peroxydase-PVP (Polyvinylpyrrolidon) bieten gute Möglichkeiten, den Einfluss des Wassergehaltes auf die Bestrahlungsempfindlichkeit eines Systems näher zu untersuchen. Peroxydase ist bereits als ziemlich bestrahlungsempfindliches Enzym bekannt; seine D37-Dosis beträgt $25;10^3$ rad in einer wässrigen Lösung von $7;10^{-4}$ mg/ml bei pH 7 (6). Was unsere Trägermaterialien betrifft, wird Zellulose in trockenem Zustand von allen Strahlen depolymerisiert; bei Anwesenheit von Wasser kann auch eine Verzweigung des Moleküls auftreten (7). Auch PVP verzweigt sich als Folge von Bestrahlung in trockenem Zustand. Bei Bestrahlung in Lösung kann sowohl Verzweigung als auch Kettenabbau (8) als indirekter Effekt auftreten. Bei Stärke wurde gefunden (9), dass durch Bestrahlung Radikale entstehen, deren Lebensdauer vom Wassergehalt abhängt. Über eventuelle Abbauprodukte ist noch wenig bekannt. Untersuchungen von REUSCHL & GUILBOT (10) bei sehr hoher Dosis ($3;10^7$ rad) ergaben einen starken Einfluss des Wassers auf den Kettenabbau (nur bei einem Wassergehalt über 21 %), die Bildung von Glukose (Zunahme mit Wassergehalt) und Oxydationsreaktionen (Schutzwirkung).

Materialien und Methoden

Die Zusammenstellung unserer Modellsysteme, wie auch die von uns befolgten Methoden zu KF-Wasserbestimmung und Aktivitätsbestimmung wurden in früheren Publikationen bereits ausführlich beschrieben (4, 5).

Bestrahlung

Bestrahlt wurde am ITAL (Institut für die Verwendung von Atomenergie in der Landwirtschaft, Wageningen, Niederlande) mittels eines Van de Graaf Elektronenbeschleunigers (High Voltage Engineering Company; Model GS; 1,5 MeV). Die Versuche wurden so durchgeführt, dass die Muster eine Dosis von $108;10^3$ rad über ihre gesamte Dicke per Passage erhielten. Dazu mussten die Muster bei einem Abstand von 5 cm und einer Schnelligkeit von 3,5 cm sec^{-1} hin und her bewegt werden, wobei ein Aluminium-Absorber (205,5 mg cm^{-2}) die Elektronen so abschirmte, dass die Dicke der Muster dem Maximum der Bragg-Kurve entsprach. Während der Bestrahlung wurde durch schmelzendes Eis eine Temperatur von 0°C eingehalten. Als Dosimeter dienten blau gefärbte Cellophanfolien (Du Pont 195, MSC, Dicke 25.10^{-3}, 11).

Vorbereitung der Muster

Je 2 g Polymer (CMC Edifas B 10 ICI, lösliche Stärke Fluka, PVP K25 Fluka) wurden mit 2 mg Meerrettich-Peroxydase (E.C.1.11.1.7.; Worthington Biochemical Corporation) in 100 ml dest. Wasser gelöst, auf das gewünschte pH gebracht und gefriergetrocknet. Das trockene Material wurde gemahlen, in 42 Polyäthylen-Sachets verteilt und während 6 Tagen bei 2°C über Silikagel nachgetrocknet. Anschliessend wurden Muster verschiedener Feuchtigkeit

erhalten, indem die Sachets in Exsikkatoren verteilt wurden, worin sie 2 Wochen lang über gesättigten Salzlösungen (5) mit einer bestimmten relativen Luftfeuchtigkeit (r.L.) ins Gleichgewicht gebracht wurden. Danach wurden die Sachets zugeschweisst, bestrahlt und direkt nach der Bestrahlung in Lösung gebracht. Die Aktivität wurde dann jeweils nach einer Nacht und nach sieben Tagen Stehenlassen (Kühlschrank, 2 – 5°C) bestimmt.

Berechnung der Bestrahlungsempfindlichkeit

Als Mass der Bestrahlungsempfindlichkeit wurde die D37-Dosis gewählt (12). Dies ist ein geschätzter Wert, welcher aus einer Regressionsgleichung hervorgeht, die mittels eines Komputers (Control Data 3200) aus den natürlichen Logarithmen der Restaktivitäten nach verschiedenen Bestrahlungsdosen berechnet wird, wobei eine lineare Funktion vorausgesetzt wird (Abb. 1a und 1b). Die Schätzung wird nur dann angenommen, wenn der Korrelationskoeffizient zwischen –0,95 und –1,00 liegt.

Wenn die Inaktivierung tatsächlich exponentiell verläuft, gilt $A = Ao.e^{-RD}$; $\ln A = Ao - RD$. Wenn $RD = 1$ gesetzt wird, gilt $A = \frac{1}{e}Ao = 0.37\ Ao$. Man kann schreiben $D37.R = 1$, wobei dann D37 diejenige Strahlungsdosis ist, welche nötig ist, um die Enzym-Aktivität auf 37% zu reduzieren. Die D37-Dosis ist also aus einer Geraden abzulesen, welche die Gleichung in $A = \ln Ao - \frac{1}{D37} \cdot D$ erfüllt. Da diese Gerade berechnet ist, um einer Reihe von Messwerten am besten zu entsprechen, spricht man auch von einem geschätzten D37-Wert. Beim Umschreiben obiger Gleichung auf $D = -D37 \ln A + \text{Konstante}$ sieht man, dass D37 auch als Richtungskoeffizient der Regressionsgeraden aufzufassen ist. Dabei ist

A = Enzymaktivität bei Dosis D (in % von Ao)
Ao = Enzymaktivität des unbestrahlten Musters (100 %)
R = empirische Konstante
D = Bestrahlungsdosis
n = Anzahl Messpunkte

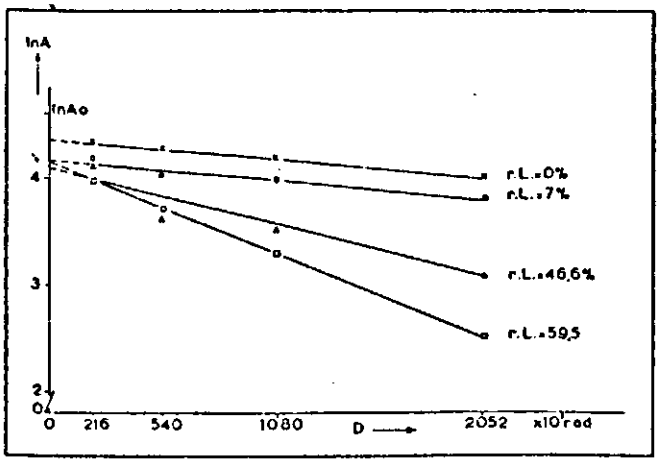
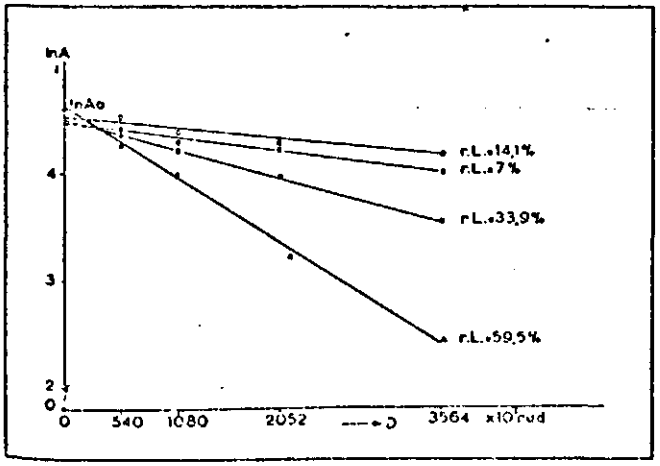


Abb. 1a Inaktivierungskurven des Systemes Peroxydase-Stärke pH 7, berechnet aus den angegebenen Messpunkten. A = Restaktivität; Ao = Aktivität vor Bestrahlung.

Abb. 1b Inaktivierungskurven des Systemes Peroxydase-CMC pH 6, berechnet aus den angegebenen Messpunkten. A = Restaktivität; Ao = Aktivität vor Bestrahlung.



Resultate

Inaktivierungskurven

Abb. 1 a zeigt einige Inaktivierungskurven des Systems Stärke-Peroxydase bei pH 7. Es fällt auf, dass die extrapolierten Kurven nicht durch Ao gehen, wobei die Kurve mit r.L. =0 % die Ordinate noch am nächsten zu diesem Punkt schneidet. Auch andere Stärke-Peroxydase-Systeme zeigten dieses Verhalten. Demgegenüber schneiden die verlängerten Inaktivierungsgeraden der Systeme CMC-Peroxydase und PVP-Peroxydase die Ordinate in nur unwesentlichen Abständen vom Punkt Ao, wie Abb. 1b am Beispiel des Systemes CMC-Peroxydase pH 6 zeigt.

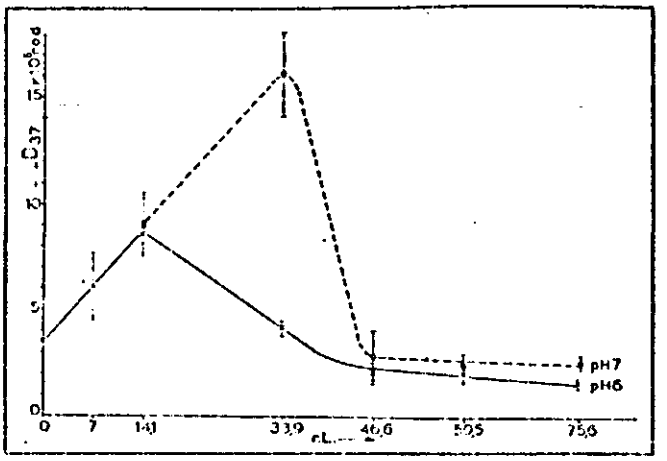
CMC-Peroxydase

Abb. 2 zeigt, dass die grösste Strahlungsempfindlichkeit bei r.L. = 0 % und bei r.L. > 46,6 % herrscht. Über das ganze Messgebiet ist das Enzym empfindlicher bei pH 6 als bei pH 7, wobei auch eine Maximumverschiebung auftritt. In der pH 7-Kurve sind keine D37-Dosen für r.L. = 0 % und r.L. = 7 % aufgenommen, da die oben beschriebene Methode keine befriedigende Schätzung ergab (Korrelation < -0,9).

Stärke-Peroxydase

Aus Abb. 3 geht hervor, dass das Enzym auch in diesem System bei tieferen pH-Werten empfindlicher auf Bestrahlung reagiert. Sowohl bei pH 4 wie auch bei pH 7 nimmt die Empfindlichkeit mit steigender Feuchtigkeit zu; dabei meinen wir in beiden Kurven, die allerdings aus Durchschnittswerten bestehen, einen Knickpunkt bei r.L. = 33,9 % zu sehen. Dies wäre auch das Feuchtigkeitsgebiet, in welchem freies Wasser vorzukommen beginnt. Die Pufferung des Systemes mit Veronal-Azetat auf pH 8 erhöht die Strahlungsresistenz gewaltig. Auch hier war für die Messwerte bei r.L. = 0 % und r.L. = 7 % eine zuverlässige Schätzung der

Abb. 2 Bestrahlungsempfindlichkeit der Systeme Peroxydase-CMC pH 7 und pH 6 bei verschiedenen r.L.-Werten.



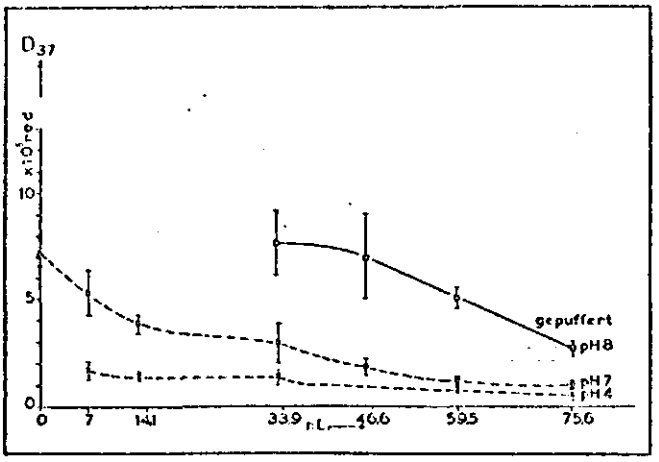


Abb. 3 Bestrahlungsempfindlichkeit der Systeme Peroxydase-Stärke pH 4, pH 7, pH 8 (gepuffert) bei verschiedenen r.L.-Werten.

D37-Dosis nicht möglich. Übrigens trat in diesem System als Folge der Bestrahlung eine Bräunung auf, welche mit zunehmender Dosis und abnehmender Feuchtigkeit intensiver wurde.

PVP-Peroxydase

Abb. 4 zeigt allein die Werte bei pH 7; bei tieferem pH ist der Aktivitätsverlust schon während der Vorbehandlung beinahe vollständig (4). Die grösste Strahlungsempfindlichkeit zeigt sich in diesem System bei den Extrem-r.L.-Werten 0 % und 75,6 %.

"Innere" Bestrahlungsempfindlichkeit

SANNER & PIHL (13) definierten als "intrinsic radiosensitivity" den reziproken Wert der Neigung der Kurve D37 = f (Enzymkonzentration). Um dieses interessante Empfindlichkeitsmass an unseren getrockneten Systemen ausprobieren zu können, betrachten wir dieselben ab r.L. = 46,6 % als hochkonzentrierte Lösungen. Tiefere r.L.-Werte werden nicht berücksichtigt, um mit Sicherheit im Gebiete von freiem Wasser zu sein (14). Als Konzentration verwenden wir dann die reziproken Werte der Wassergehalte der Präparate bei den verschiedenen r.L.-Werten, wie wir sie bereits publiziert haben (5). Die so berechneten Werte sind in Tab. 1 zusammengefasst. Auch bei niedrigen Korrelationskoeffizienten ist daraus doch zu sehen, dass im neutralen pH-Gebiet Peroxydase auf Stärke und auf CMC rund doppelt so empfindlich ist als auf PVP. Der Vergleich von Peroxydase-Stärke bei pH 4 und pH 7 zeigt eine weitere starke Zunahme der Empfindlichkeit beim tieferen pH.

Tab. 2b Nacheffekt in % in den wässrigen Lösungen der bestrahlten Modelle nach einer Woche Inkubation bei 2 – 5°C

r.L. während der Bestrahlung	CMC pH 6	CMC pH 7	Stärke pH 4	Stärke pH 7	Stärke pH 8 gepuffert
0	35	–	–	42	–
7	48	–	61	74	–
14,1	77	–	66	65	–
33,9	58	56	60	37	45
46,6	31	11	–	44	40
59,5	35	20	55	47	37
75,6	19	15	63	26	5

Nacheffekt

Die bisher gemachten Aussagen beziehen sich alle auf die Restaktivitäten der bestrahlten Muster, welche in Lösungen gemessen wurden, die direkt nach der Bestrahlung gemacht und vor der Messung über Nacht in einem Kühlschrank (2-5°C) stehen gelassen wurden. Nach einer weiteren Woche Stehen der Lösungen bei 2-5°C wurden nochmals Aktivitätsbestimmungen durchgeführt und daraus neue, scheinbare D37-Werte errechnet. Bezeichnen wir diese als D'37, so können wir als Nacheffekt definieren:

$$\text{Nacheffekt} = \frac{D37 - D'37}{D37} \cdot 100\%$$

In Tab. 2a sind die ursprünglichen und scheinbaren D37-Werte und in Tab. 2b die berechneten Nacheffekte dargestellt. Bei PVP war kein wesentlicher Unterschied zwischen D37 und D'37 festzustellen. Bei den Modellen mit CMC und mit Stärke sind die Unterschiede der D'37-Werte geringer als diejenigen der D37-Werte. Man kann deshalb sagen, dass der Nacheffekt nivellierend wirkt. Dass die Aktivitätsabnahme kein Lagereffekt ist, geht aus unseren früheren Messungen (5) hervor. Auch würde ein Lagereffekt nur eine Parallelverschiebung der Inaktivierungsgeraden bewirken und D'37 würde als Neigung hiervon gleich D37 bleiben.

Diskussion

In unseren Modellen kann man sich die Peroxydase-Moleküle in verschiedenen Zustandsformen denken (15). Sie können inaktiviert sein (Zustand a), sie können als aktive

Tab. 1 Die innere Strahlungsempfindlichkeit (I.S. = intrinsic radio sensitivity) der Systeme CMC-Peroxydase, Stärke-Peroxydase und PVP-Peroxydase Ek = reziproker Wert des Wassergehaltes (Enzymkonzentration)

System		Regressionsgleichung	Korrelationskoeffizient	I.S. = Reziproke Neigung	Verhältnis werte der I.S.
CMC	pH 6	D37 = 28,5 Ek + 0,43	0,5877	0,035	4
	pH 7	D37 = 4,9 Ek + 2,41	0,0716	–	–
Stärke	pH 4	D37 = 16,0 Ek – 0,58	0,8014	0,063	7
	pH 7	D37 = 26,3 Ek – 0,83	0,8429	0,038	4
Stärke + Puffer	pH 8	D37 = 116,0 Ek – 7,33	0,7947	0,009	1
PVP	pH 7	D37 = 64,2 Ek + 3,15	0,7694	0,016	2

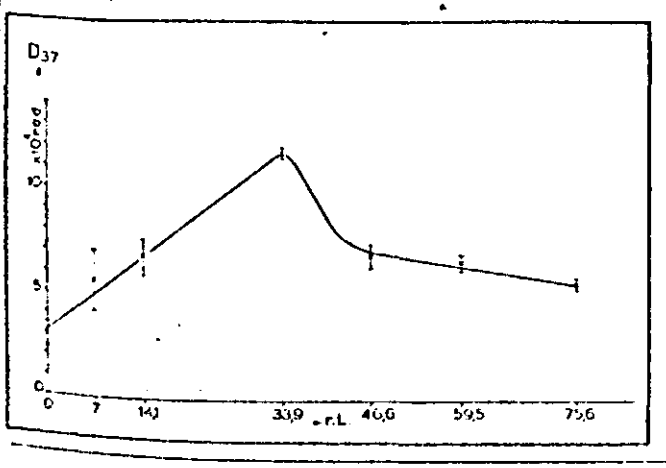
r.L. während der Bestrahlung	CMC pH 6 D37	CMC pH 6 D'37	CMC pH 7 D37	CMC pH 7 D'37	Stärke pH 4 D37	Stärke pH 4 D'37	Stärke pH 7 D37	Stärke pH 7 D'37	Stärke pH 8 gepuffert D37	Stärke pH 8 gepuffert D'37
0	3,5	2,3	–	–	–	–	7,2	4,2	–	–
7	6,0	3,1	–	–	1,6	0,6	5,4	1,4	–	–
14,1	8,5	2,0	9,0	–	1,4	0,5	3,7	1,3	–	–
33,9	4,0	1,7	16,0	7,0	1,3	0,8	2,9	1,8	7,6	4,2
46,6	2,2	1,5	2,8	2,5	–	–	1,8	1,0	7,0	4,2
59,5	2,0	1,3	2,5	2,0	0,8	0,4	1,2	0,6	5,0	3,2
75,6	1,5	1,2	2,7	2,3	0,5	0,2	1,0	0,7	2,8	2,7

Tab. 2a Nacheffekte und Bestrahlungsempfindlichkeiten von bestrahlten Peroxydase-Modellen. D 37 = Bestrahlungsempfindlichkeit, angegeben in rad·10^6. Zur Bestimmung der D 37-Werte wurden die bestrahlten Präparate über Nacht stehen gelassen. D'37 = Nacheffekt, ausgedrückt in rad·10^6. Die Bestimmung der D'37-Werte erfolgte an 7 Tage alten Präparaten, die zwischen 2 – 5°C aufbewahrt wurden.

Enzymmoleküle fest an das Polymer gebunden sein (Zustand b) oder sie können als "freie" Moleküle eventuell locker adsorbiert, neben dem Polymer vorkommen (Zustand c). Über die "Lagerungsinaktivierung" oder "Adsorptionsinaktivierung", welche zu Zustand a leiten, haben wir in früheren Publikationen bereits berichtet (4, 5). Die Tatsache, dass beim Stärke - Peroxydase - Modell die Inaktivierungsgeraden nicht durch den Punkt ln Ao gehen (Abb. 1a), kann durch das nebeneinander Vorhandensein dieser verschiedenen Zustandsformen, welchen verschiedene Bestrahlungsempfindlichkeiten zuzuschreiben sind, erklärt werden. Dies entspricht auch dem Konzept von FLETCHER & OKADA (16), die beim System Zellulose-DNase ähnliche Resultate fanden. Es ist auch interessant zu beobachten, dass beim Modell Peroxydase-Stärke die Bestrahlungsempfindlichkeit bereits im Gebiete r.L. = 0 % bis r. L. = 33,9 %, wo nur gebundenes Wasser vorliegt (14), mit steigender Feuchtigkeit zunimmt (Abb. 3). OKADA & FLETCHER (17), sowie WEDEMEYER (3) erklären dies mit verbessertem Energietransport.

Für das Vorhandensein eines starken Komplexes der Peroxydase mit den beiden anderen untersuchten Polymeren (CMC und PVP) sprechen folgende experimentelle Befunde: Im Gegensatz zur beschriebenen starken Abweichung der extrapolierten und experimentell bestimmten ln Ao-Werte bei Stärke sind bei CMC und PVP diese Abweichungen nicht wesentlich. Man kann daraus dieselbe Empfindlichkeit und damit dieselbe Bindungsart aller Enzymmoleküle ableiten. Dass es sich dabei um einen Komplex handelt, geht daraus hervor, dass die D37-Werte bei r.L. = 0 % voneinander verschieden sind. Bei gewöhnlichen Gemischen müsste dieser Wert unabhängig vom Trägermaterial derselbe sein (1). Die D37-Werte von CMC-Peroxydase und PVP-Peroxydase liegen auch tiefer als die von Stärke-Peroxydase. Die Maxima in Abb. 2 und Abb. 4 können so erklärt werden, dass es mit zunehmender Feuchtigkeit den Trägermolekülen ermöglicht wird, sich bei der Bestrahlung zu verzweigen (7, 8). Dadurch nehmen sie selbst mehr Energie auf und beschützen das Enzym. Von r.L. = 33,9 % an ist "freies" Wasser möglich (14), welches Radikale bilden kann, wodurch die Strahlungsempfindlichkeit wieder zunimmt (indirekter Bestrahlungseffekt).

Abb. 4 Bestrahlungsempfindlichkeit des Systemes Peroxydase-PVP pH 7 bei verschiedenen r.L.-Werten.



Dank

Wir danken der Direktion und den Mitarbeitern des Institutes für die Anwendung von Atomenergie in der Landwirtschaft (ITAL), Wageningen/Holland, für ihr Interesse und ihre Hilfe.

Literatur

1 AUGENSTINE, L.G., Advan. Enzymol., *24*, 359 (1962)
2 BRAAMS, R., HUTCHINSON, F., RAY, D., Nature, *182*, 1506 (1958)
3 WEDEMEYER, G.A., Thesis, University of Washington, Seattle, Washington, USA (1965)
4 ROOZEN, J.P. und PILNIK, W., Lebensm.-Wiss.u.Technol., *3*, 37 (1970)
5 ROOZEN, J.P. und PILNIK, W., Lebensm.-Wiss. u. Technol., *4*, 24 (1971)
6 AL-JASIM, Thesis, Michigan State University, Ann Arbor, USA (1966)
7 CHAPIRO, A., Radiat. Res., *Suppl. 4*, 179 (1964)
8 ALEXANDER, P. und CHARLESBY, A., J. Polymer Sci., *23*, 355 (1957)
9 FRITSCH, G. und BOULDOIRES, J.P., Mitt. Gebiete Lebensm.-Unters.u.Hyg., *60*, (4), 245 (1969)
10 REUSCHL, H. und GUILBOT, A., Stärke, *18*, 73 (1966)
11 DAVIES, J.M. und McQUE, B., Intern. J. Appl. Radiat. Isotopes, *21*, 283 (1970)
12 GORIN, G., WANG, S.F. und SETH, T.D., Intern. J. Radiat. Biol., *16*, 93 (1969)
13 SANNER, T. und PIHL, A., Radiat. Res., *19*, 12 (1963)
14 KUPRIANOFF, J., in "Fundamental aspects of the dehydration of foodstuffs", page 14, Soc. Chem. Industry, London, England (1958)
15 HOLLADAY, W., AUGENSTEIN, E. und AUGENSTEIN, L., Radiat. Res., *28*, 132 (1966)
16 FLETCHER, G.L. und OKADA, S., Radiat. Res., *11*, 291 (1959)
17 OKADA, S. und FLETCHER, G.L., Radiat. Res., *13*, 92 (1960)

Über die Stabilität adsorbierter Enzyme in wasserarmen Systemen
IV. Der Effekt von Lagerung und Elektronenbestrahlung auf die Stabilität von Pektinmethylesterase

J.P. Roozen und W. Pilnik

Landwirtschaftliche Hochschule, Abteilung für Lebensmittelwissenschaft,
Wageningen (Niederlande)
(Received April 16, 1971, lwt 100)

Der Einfluss von Lagerung und Bestrahlung auf die Systeme CMC-Pektinmethylesterase, Stärke-Pektinmethylesterase, PVP-Pektinmethylesterase und Na-Pektat-Pektinmethylesterase wurde studiert. Die höchste Stabilität wurde bei Lagerung über Silikagel festgestellt. Die höchste Strahlungsstabilität lag bei allen Systemen bei etwa 40 % r.L. mit Ausnahme von PVP-Pektinmethylesterase, welche bei stark schwankenden Werten mit steigender Feuchtigkeit stabiler zu werden scheint. Durch Bestrahlung sinkt das pH von Stärke-Pektinmethylesterase.

On the stability of adsorbed enzymes in water deficient systems.
IV. The effect of storage and electron irradiation on the stability of pectin methyl esterase.

The influence of storage and irradiation on the systems Pectinmethylesterase-CMC, PME-Starch, PME-PVP and PME-Sodium pectate was investigated. Storage over Silicagel gave generally the highest stability. The highest irradiation stability for all systems was found to exist at ca. 40 % relative humidity with the exception of PME-PVP which gave very variable results which indicate increased stability with increased humidity. Irradiation caused the pH of PME-Starch to decrease.

Einleitung

Pektinmethylesterase (PME) ist ein ziemlich gut beschriebenes Enzym. Eine kurze Übersicht findet man bei PILNIK und VORAGEN (1). Für unsere eigenen Untersuchungen ist vor allem die von JANSEN et al. (2) beschriebene Adsorption vom PME an der Zellwand interessant. Diese wird aus drei Gründen mit der Bildung eines (nicht spezifischen) Enzym-Substratkomplexes verglichen:

1) Beim Abbau von Pektinstoffen erfolgt auch ein damit parallel verlaufender Verlust an Bindungskapazität der Zellwände;
2) Zellwände mit vollständig verseifter Pektinkomponente behalten eine starke Affinität für PME und
3) α-Chymotrypsin wird gebunden.

Auch über die Strahlungsempfindlichkeit pektolytischer Enzyme liegen bereits Angaben vor (3), wonach PME vor allem gegenüber den aus Wasser gebildeten Radikalen empfindlich ist (4). Nach VAS et al. (5) ist bei Tomaten die im Saft lösliche PME-Fraktion strahlungsempfindlicher als die an der Zellwand adsorbierte Fraktion. Wie bei Peroxydase (6, 7, 8) interessierte uns auch bei diesem Enzym die Lager- und Bestrahlungsstabilität auf den Matrices Carboxymethylcellulose (CMC), lösliche Stärke und Polyvinylpyrrolidon (PVP). Zusätzlich wurde auch der Einfluss von Natrium-Pektat (NaP) als Träger untersucht.

Materialien und Methoden

Die Inkubation der gefriergetrockneten Systeme (7), die Karl-Fischer Feuchtigkeitsbestimmung (6), die Bestrahlung (8) sowie die Berechnung der Bestrahlungsempfindlichkeit (8) sind in den genannten Publikationen beschrieben.

Vorbehandlung des Enzymes und der Polymeren

Mit einem käuflichen PME-Präparat (Tomaten-PME E.C. 3.1.1.11., Worthington Biochemical Corporation) wird durch Suspendieren in 3 % NaCl-Lösung eine Vorratslösung (120 mg per 10 ml) hergestellt. Diese Lösung ist trüb, weist aber die vom Lieferanten angegebene Aktivität von 60 I.U. per mg auf. Auf Grund früherer Erfahrungen (7) wird PVK K 25 (Fluka) vorgetrocknet. Eine käufliche Pektinsäure (Obipektin A.G., CH–Bischofszell) mit etwa 10 % Restveresterung wird nach ALTERMATT (9) vollständig verseift. CMC (Edifas B10, ICI) und lösliche Stärke (Fluka) werden ohne weitere Behandlung gebraucht.

Modellsysteme

Von den Polymeren werden 2%ige Lösungen hergestellt, wovon je 150 ml mit 1 ml der PME-Vorratslösung gemischt werden. Die Mischungen werden neutralisiert (pH 7) und ergeben trockene Systeme mit 1 % NaCl. Die weitere Behandlung der PME-Modelle entspricht derjenigen der schon beschriebenen Peroxydase-Systeme (7, 8).

PME-Aktivitätsbestimmung

Als Mass der Aktivität gilt der Verbrauch von Lauge, der nötig ist, um die bei 25°C durch Verseifung freiwerdenden Carboxylgruppen eines Pektinsubstrates auf pH 7,5 neutralisiert zu halten. Dazu wird ein Reaktionsgemisch (10 ml Modell-Lösung und 25 ml Pektinlösung) hergestellt, in welchem die Endkonzentrationen 0,7 % Pektin (Grünband Apfelpektin, 64 % Veresterung, Bezugsquelle: Obipektin AG, CH-Bischofszell) und 0.07 M NaCl betragen. Das Reaktionsgemisch wird mit Hilfe des automatisch registrierenden Titrators (Combititrator 3D, Metrohm AG, CH-Herisau) unter Verwendung von 0,01 N NaOH auf pH 7,5 gehalten. Die Aktivität wird aus der linearen Laugeverbrauch-Zeit-Funktion berechnet. Eine solche lineare Abhängigkeit liegt für die angegebenen Verhältnisse vor, wenn die Enzymaktivität 2–13 I.U. beträgt. Dem oft beschriebenen Aktivierungseffekt von NaCl auf PME (10, 11, 12) wird dadurch Rechnung getragen, dass der Pektinlösung NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0,1 M zugesetzt wird. Um allfälliges CO_2 auszuschliessen, wird die Pektinlösung bereits über Nacht mit N_2 gespült und dann auf pH 6 eingestellt. Die Titration erfolgt ebenfalls unter N_2-Strom.

Resultate

Wasseraufnahme der Systeme

Tab. 1 zeigt die Wassergehalte der PME Modell-Systeme nach dem Erreichen des Gleichgewichtes. Diese liegen für die verschiedenen relativen Luftfeuchtigkeits (r.L.)-Werte im Fall von CMC, PVP und NaP nicht weit voneinander; lediglich das System mit löslicher Stärke adsorbiert deutlich weniger Feuchtigkeit. Ähnlich wie bei den Peroxydase-Modellen (6) ist auch hier bei einer r.L. = 75 % das CMC-Modell klebrig, das Stärke-Modell ein harter Block und das PVP-Modell beginnt zu verfliessen. Natrium-Pektat verhält sich in dieser Beziehung wie CMC.

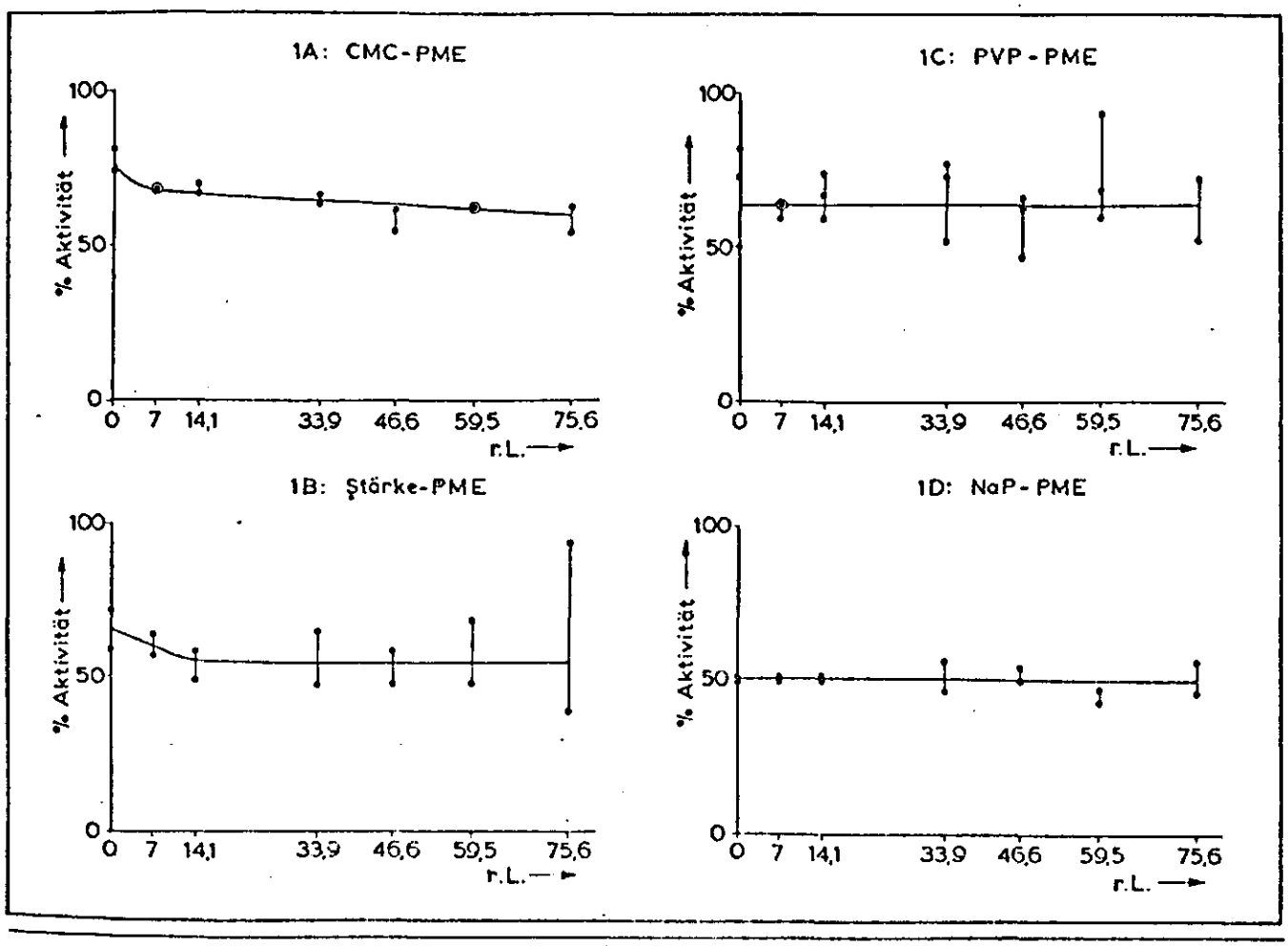
Tab. 1 Wassergehalte in % des Gesamtgewichtes der gefriergetrockneten Modellsysteme nach 2 Wochen Inkubation über Silikagel und gesättigte Salzlösungen bei 2°C

Salze	% r.L.	CMC	lösliche Stärke	PVP	Na-Pektat
Silikagel	0	3,5	3,5	3	3,5
$NaOH.H_2O$	7	5,5	4	5.5	7
$LiCl.2H_2O$	14,1	8	5	8	8
$MgCl_2.6H_2O$	33,9	11,5	7	14	12,5
$NaJ.2H_2O$	46,6	14,5	8	16	16,5
$Mg(NO_3)_2.6H_2O$	59,5	21,5	11,5	22	20,5
NaCl	75,6	27,5	12,5	27	27,5

Lagerungseffekte

Die Behandlung des Enzymes vor Beginn der Inkubation bewirkt einen Aktivitätsverlust von ca. 25 %. Ferner sinkt

Abb. 1 Restaktivität von Pektinmethylesterase nach 2 Wochen Inkubation bei verschiedenen Wasseraktivitäten in % der "eingewogenen" Aktivität (pH 6,5).



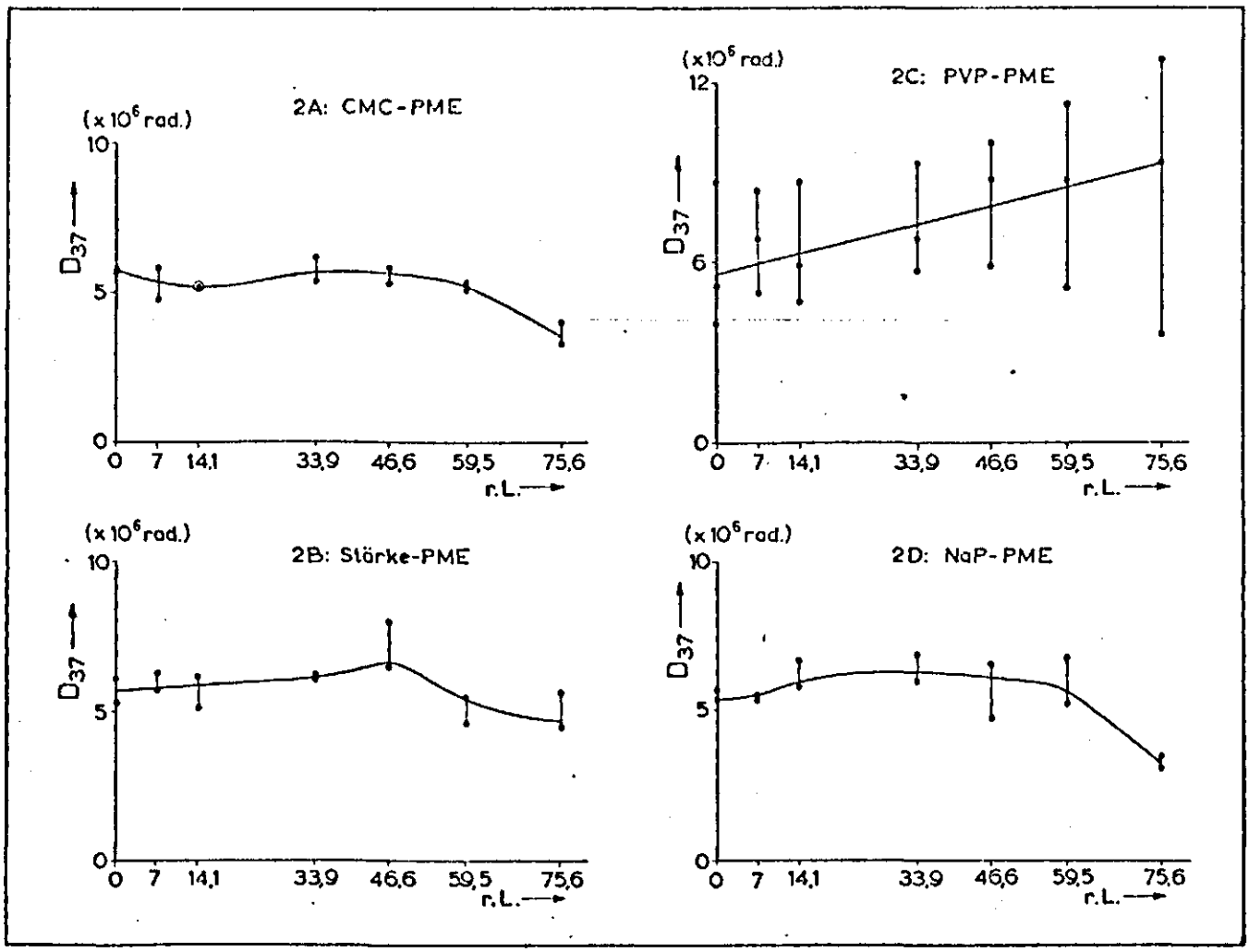


Abb. 2 Bestrahlungsempfindlichkeit von Pektinmethylesterase bei verschiedenen Wasseraktivitäten und pH 6,5.

das pH von 7 nach 6,5. Dieser Aktivitätsverlust muss bei der Betrachtung von Abb. 1, worin die Restaktivität nach der Lagerung in % der eingewogenen Aktivität angegeben ist, berücksichtigt werden. Die Stabilität des Systems CMC – PME (Abb. 1A) nimmt mit zunehmenden r.L.-Werten ab – durchschnittlich liegt das Aktivitätsniveau bei 65 %. Auch das System Stärke – PME (Abb. 1B) ist bei grösster Trockenheit am stabilsten. Das Restaktivitätsniveau liegt mit 55 % etwas tiefer. Die Resultate des Systems PVP – PME streuen stark (ABB. 1C); die Restaktivität kann auf durchgehend ca. 64 % geschätzt werden. Die geringste Restaktivität zeigt das Modell NaP – PME (Abb. 1D) mit 50 %; ähnlich wie bei PVP scheint die r.L. keinen Einfluss zu haben. Werden die Lösungen der Systeme bei 2°–5°C aufbewahrt, so sinkt die Aktivität innert einer Woche um 25–60 %.

Bestrahlungseffekt

Die Bestrahlungsempfindlichkeit der PME in einem bestimmten System kann durch den D37-Wert ausgedrückt werden, der mittels linearer Regression aus den natürlichen Logarithmen der Restaktivitäten als Funktion der Bestrahlungsdosis für jeden r.L.-Wert errechnet wird (8). Die Empfindlichkeit ist dann diesem D37-Wert umgekehrt proportional. Die Regressionsgeraden schneiden die Aktivitätsordinate nahe beim Punkt $\ln A_0$ (Aktivität des unbestrahlten Musters). In Abb. 2 sind die D37-Werte für die verschiedenen r.L.-Werte aufgezeichnet. Daraus geht hervor, dass im Modell PME – CMC die Empfindlichkeit erst bei hoher r.L. etwas zunimmt (Abb. 2A), während beim System PME-Stärke (Abb. 2B) ein schwaches Empfindlichkeitsminimum bei r.L. = 46,6 % besteht. Die grossen Schwankungen in der Kurve des Systemes PME –PVP (Abb. 2C) sind teilweise auf die Schwankungen in den Lager-Restaktivitäten zurückzuführen (Abb. 1C). Aus diesen Beobachtungen kann höchstens global geschlossen werden, dass die D37-Werte mit zunehmender Feuchtigkeit zunehmen. Das Modell PME –NaP (Abb. 2D) weist die grösste Empfindlichkeit bei den Extrem-r.L.-Werten der Versuchsbedingungen auf.

"Innere" Bestrahlungsempfindlichkeit

Diese "intrinsic radio-sensitivity" wurde genau wie für die früher beschriebenen Versuche mit Peroxydase (8) berechnet. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, ist die Empfindlichkeit von PME mit NaP gerade die Hälfte der Empfindlichkeit des Enzymes mit CMC oder Stärke. Aus den Korrelationskoeffizienten geht hervor, dass die gefundenen Werte des Systems PME –PVP keine Aussagen gestatten.

Nach-Effekt

Dieser Wert ist als $\frac{D37-D'37}{D37} \cdot 100\,\%$ definiert, wobei D'37 scheinbare D37-Werte darstellen, zu deren Berechnung die Restaktivitäten nach Bestrahlung und nach einer Woche stehen im Kühlschrank (2–5°C) herangezogen werden (8). In

Tab. 3 sind die Durchschnittswerte von D37 und D'37 eingesetzt. Die Schwankungen dieser Werte, die auch aus Abb. 2 hervorgehen, erlauben keine Aussage über einen Nacheffekt.

pH-Veränderungen

Aus pH-Messungen in den Lösungen geht hervor, dass im System mit Stärke ein Absinken des pH-Wertes als Funktion der Bestrahlungsdosis zu verzeichnen ist (Tab. 4). Die durchschnittliche pH-Veränderung beträgt 0,2 Einheiten per 10^6 rad. Das Entstehen von Säure beim Bestrahlen von Stärke wurde auch von anderen Autoren festgestellt (13, 14).

Diskussion

Die gefriergetrockneten PME-Polymer Systeme, welche den Gegenstand der vorliegenden Arbeit bilden, enthalten alle

Tab. 2 Die innere Strahlungsempfindlichkeit (I.S.) von Pektinmethylesterase mit verschiedenen Polymeren bei pH 6,5 und bei verschiedenen Wassergehalten $\left(\frac{1}{E_k}\right)$

System	Regressionsgleichung	Korrelationskoeffizient	Reziproker Richtungskoeffizient	Verhältnis der I.S.
CMC	D37 = 51,5 Ek + 2,18	0,814	0,019	2
Stärke	D37 = 50,9 Ek + 0,85	0,847	0,020	2
PVP	D37 = −11,7 Ek + 9,00	0,045	–	–
NaP	D37 = 98,8 Ek + 0,20	0,714	0,010	1

Tab. 3 Nacheffekt ausgedrückt durch die D37-Werte (x 10^{-6} rad) bei pH 6,5 und bei verschiedenen Wasseraktivitäten

D37 = berechnet aus den Restaktivitäten nach bestrahlen, auflösen und eine Nacht stehen.
D'37 = berechnet aus den Restaktivitäten nach bestrahlen, auflösen und 7 Tage bei 2–5°C stehen.

r.L. während der Bestrahlung	CMC D37	CMC D'37	Stärke D37	Stärke D'37	PVP D37	PVP D'37	Na-Pektat D37	Na-Pektat D'37
0	5,8	5,9	5,7	5,0	6,6	5,8	5,6	5,2
7	5,3	5,2	6,0	5,3	6,7	6,1	5,5	7,1
14,1	5,2	4,7	5,7	5,2	6,4	7,5	6,3	6,5
33,9	5,8	5,6	6,2	6,0	7,2	5,7	6,5	8,1
46,6	5,6	5,2	7,2	5,3	8,2	7,0	5,7	4,6
59,5	5,2	5,7	5,1	4,3	8,4	4,4	6,0	4,3
75,6	3,7	3,6	5,1	5,0	8,6	2,8	3,3	3,2

Tab. 4 Die pH-Senkung im PME-Stärke-System als Funktion der Bestrahlungsdosis (D)

r.L. während der Bestrahlung	Regressionsgleichung	Korrelationskoeffizient	Mittelwerte des pH unbestrahlt	Durchschnittliche pH-Senkung per 10^6 rad
0	pH = −0,22D + 6,2 pH = −0,17D + 6,5	0,987 0,933	6,3	0,20
7	pH = −0,17D + 6,1 pH = −0,12D + 6,4	0,972 0,653	6,2	0,15
14,1	pH = −0,16D + 6,3 pH = −0,12D + 6,3	0,900 0,941	6,3	0,14
33,9	pH = −0,21D + 6,3 pH = −0,26D + 6,4	0,996 0,990	6,3	0,24
46,6	pH = −0,21D + 6,4 pH = −0,24D + 6,2	0,967 0,991	6,3	0,23
59,5	pH = −0,22D + 6,4 pH = −0,17D + 6,1	0,971 0,934	6,2	0,20
75,6	pH = −0,12D + 6,3 pH = −0,16D + 6,1	0,911 0,975	6,2	0,14

Kochsalz. Beim Trocknen und der Inkubation erfolgt eine Kristallisation (15), so dass bei den tieferen r.L.-Werten kein Einfluss auf die Wasseraufnahme der Modelle ausgeübt wird. Bei höheren r.L.-Werten hingegen ist das Salz amorph und wahrscheinlich verantwortlich für die stärkere Wasseraufnahme, die bei den PME-Modellen im Vergleich zu den Peroxydase-Modellen gefunden wird (7). Ferner scheint der Ersatz von P_2O_5 durch Silikagel einen höheren Wassergehalt bei r.L. = 0 % zu verursachen (7).

Der hohe Aktivitätsverlust, der bei der Vorbehandlung zu konstatieren ist, lässt sich erklären, wenn man annimmt, dass dieser einer Fraktion des Enzyms zuzuschreiben ist, die sich nicht an den Träger bindet. Während der Inkubation findet dann nur noch ein geringer Aktivitätsabfall statt, der ziemlich unabhängig von der r.L. ist (Abb. 1). Dies spricht dafür, dass man es dabei nur noch mit "gebundenen" Enzymmolekülen zu tun hat, wie sie auch von JANSEN (s. Einleitung) beschrieben wurden. Ein weiterer Hinweis hierauf ist auch die Tatsache, dass die Inaktivierungskurven (Dosis vs Aktivität) die Aktivitätsachse nahe beim Punkt $\ln A_0$ schneiden. Die Bedeutung dieser Erscheinung haben wir bereits früher ausführlich besprochen (8).

Das von uns verwendete Enzympräparat hat einen hohen Gehalt an Kohlenhydraten (16), so dass VAS (4), der dieses Präparat bestrahlte, eigentlich auch mit einem System PME – Kohlenhydrat arbeitete. Der von ihm gefundene D37-Wert von 8,8 vergleicht sich trotzdem nur schlecht mit unseren Werten, die zwischen 3 und 7 liegen. Der Unterschied in den Systemen, vor allem das Verhältnis Enzym : Kohlenhydrat ist eben doch sehr gross. Andererseits können wir die Empfindlichkeit für Wasserradikale, die VAS (4) beschreibt, auch in der Zunahme der Empfindlichkeit bei r.L. > 46,6 % in unseren Kurven (Abb. 2) ablesen.

Dank

Wir danken Frl. Ann E. Vaughan für die sorgfältige Ausführung vieler Messungen. Die Bestrahlungen wurden wiederum mit der geschätzten Hilfe der Mitarbeiter des ITAL's (Institut für die Verwendung von Atomenergie in der Landwirtschaft) ausgeführt.

Literatur

1 PILNIK, W. und VORAGEN, A.G.J., in A.C. Hulme, The Biochemistry of Fruits and Their Products, Vol. I, Academic Press, Inc., London, 1970, p. 53
2 JANSEN, E.F., WANG, R. und BONNER, J., Food Res., *25*, 64 (1960)
3 VAS, K. und PROSZT, G., Ber. Wiss.-Techn. Komm., Int. Fruchtsaft-Union, *6*, 449 (1965)
4 VAS, K., in Enzymological Aspects of Food Irradiation, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1969, p. 37
5 VAS, K., KOVACS-PROSZT, G. und SCHEFFER, H., Int. J. Appl. Radiat. Isotopes, *19*, 273 (1968)
6 ROOZEN, J.P. und PILNIK, W., Lebensm.-Wiss.u.Technol, *3*, 37 (1970)
7 ROOZEN, J.P. und PILNIK, W., Lebensm.-Wiss.u.Technol., *4*, 24 (1971)
8 ROOZEN, J.P. und PILNIK, W., Lebensm.-Wiss. u. Technol., *4*, 93 (1971)
9 ALTERMATT, H., Diss. E.T.H. Zürich, 1954
10 LEE, M. und MacMILLAN, J.D., Biochemistry, *7*, 4005 (1968)
11 NAKAGAWA, H., YANAGAWA, Y. und TAKLHANA, H., Agr. Biol. Chem., *34*, 998 (1970)
12 VAS, K., NEDBALEK, M., SCHEFFER, H. und KOVACS-PROSZT, G., Fruchtsaft-Ind., *12*, 164 (1967)
13 GREENWOOD, C.T. und MacKENZIE, S., Stärke, *15*, 444 (1963)
14 SAMEC, M., Stärke, *12*, 99 (1960)
15 GAL, S., in "Recent developments in freeze-drying" II, International Institute of Refrigeration, Paris, 1969, p. 197
16 DELINCEE, H. und RADOLA, B.J., Biochim. Biophys. Acta, *214*, 178 (1970)

Über die Stabilität adsorbierter Enzyme in wasserarmen Systemen
V. Der Effekt von Lagerung und Elektronenbestrahlung auf die Stabilität von alkalischer Phosphatase

J.P. Roozen und W. Pilnik

Landwirtschaftliche Hochschule, Abteilung für Lebensmittelwissenschaft, Wageningen (Niederlande)
(Eingegangen 24. Mai 1971, lwt 107)

Wässrige Lösungen von AP wurden zusammen mit wässrigen Lösungen von CMC, löslicher Stärke und PVP gefriergetrocknet. Dabei lässt sich eine ungewünschte pH-Senkung durch Zufügen von Na-Bikarbonat vermeiden. Während der dreiwöchigen Vorbehandlung (1 Woche nachtrocknen, 2 Wochen Inkubation bei 2°C und bei verschiedenen r. L.-Werten) verminderte sich die eingewogene Aktivität bei CMC um 60 %, bei löslicher Stärke um 20 % und bei PVP um 40 %. Die Bestrahlungsempfindlichkeit des Enzymes resp. des Enzymkomplexes lag in allen Systemen in derselben Grössenordnung, aber mit einigen charakteristischen Merkmalen: Bei r. L. > 46,6 % nahm sie bei PVP ab, während sie bei CMC und löslicher Stärke zunahm. Die Empfindlichkeit war auch geringer in Modellen mit höheren Enzymkonzentrationen. Ein Nacheffekt liess sich bei PVP-AP nicht feststellen; bei CMC und löslicher Stärke als Trägermaterial war er messbar und grösser bei den Modellen mit geringer Enzymkonzentration.

On the stability of adsorbed enzymes in water deficient systems
V. The effect of storage and irradiation by electrons on the stability of alkaline phosphatase.

Aqueous solutions of alkaline phosphatase were freeze-dried together with aqueous solutions of CMC, soluble starch and PVP. An undesirable lowering of the pH-values could be prevented by the addition of Na-bicarbonate. During the 3 weeks pretreatment (1 week after drying, 2 weeks incubation at various relative humidities) the original activity dropped to 40 % in the system CMC-Alkaline Phosphatase, to 80 % in the system with soluble starch and to 60 % in the system with PVP. Radiation sensitivity of the enzyme (resp. the enzyme-polymer complex) was roughly the same for all the polymers. However, at relative humidities over 46,6 % there was a decrease of the sensitivity in the PVP systems and an increase in the CMC and soluble starch systems. The radiation sensitivity was also smaller for the systems with a higher enzyme concentration. After-effects were more pronounced in the CMC and soluble starch models with the lower enzyme concentration. No after-effects could be seen in the PVP systems.

Einleitung

Alkalische Phosphatase (AP) findet sich häufig in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Bekannt ist seine Verwendung als Indikatorenzym zur Überprüfung der Pasteurisation von Milch (1, 2). Dank der Methoden von PORTMANN et al. (3) zur Isolierung und Reinigung der AP aus Kälberdünndarmschleimhaut konnten in den letzten Jahren verschiedene Eigenschaften dieses Enzymes genauer abgeklärt werden. So wird das Molekulargewicht mit 100.000 angegeben (4) und der Zn-Gehalt eines gereinigten Präparates mit 0,2 % (4). Mg-Ionen aktivieren die Phosphomonoesterase-Aktivität und hemmen die Pyrophosphatase- und ATP-ase-Aktivität (5). NIKOLSKAYA (6) untersuchte den Einfluss der Bestrahlung auf AP und schloss auf Grund des Lineweaver-Burk-Diagrammes (7) auf eine nicht-kompetitive Hemmung. Dies bedeutet, dass es sich bei der Inaktivierung des Enzymes durch ionisierende Strahlen um einen "alles oder nichts"-Prozess handelt. Blutserum (8) und wässrige Emulsionen von Octadecadienoaten (9) schützen das Enzym während der Bestrahlung. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss einiger polymerer Trägersubstanzen bei verschiedenen Wassergehalten auf die Bestrahlungsempfindlichkeit von AP.

Materialien und Methoden

Die Stabilität von AP wurde mit Methoden untersucht, die in früheren Publikationen bereits beschrieben wurden. Es handelt sich dabei um die Inkubation der gefriergetrockneten Modelle (10), die Karl-Fischer-Feuchtigkeitsbestimmung (11), die Bestrahlungsprozedur (12) und die Berechnung der Bestrahlungsempfindlichkeit (12).

Vorbehandlung des Enzymes und der Polymeren

Als Vorratslösung I sei das Enzym-Präparat bezeichnet, wie es von der Firma Boehringer, Mannheim, gekauft werden kann (Reinheitsgrad II). Es handelt sich hierbei um eine Suspension von 10 mg AP (E. C. 3. 1. 3. 1.) aus Kälberdarm per ml 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung (pH 6). Als Vorratslösung II wurde hiervon eine Verdünnung zu 2 mg Enzym

per ml 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung bei pH 6 hergestellt. Im Kühlschrank (5°C) sind beide Lösungen stabil. Durch die Herstellerfirma wird eine Aktivität von 35 I.U. per mg Enzym angegeben (Substrat: p-Nitrophenylphosphat); wir fanden aber in beiden Lösungen 80 I.U. per mg Enzym. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der aktivierenden Wirkung des von uns zur Aktivitätsbestimmung gebrauchten Ammediol-Puffers (13). Carboxymethylcellulose (CMC, Edifas B10, ICI) und lösliche Stärke (Fluka) wurden ohne weitere Reinigung angewandt; Polyvinylpyrrolidon (PVP K25, Fluka) wurde, um eine Senkung des pH-Wertes zu vermeiden, vor-gefriergetrocknet (10).

Modellsysteme

Zu je 100 ml 2 % Polymerlösung werden entweder 0,2 ml der Enzymvorratslösung I ("konzentriertes Modell") oder 0,05 ml der Vorratslösung II ("verdünntes Modell") zugefügt. Dann wird eine dem Ammoniumsulfat equivalente Menge Natriumbikarbonat in konzentrierter Lösung zugegeben. Dies ist nötig, da sonst durch das Gefriertrocknen der pH-Wert bis auf 4 sinkt, wahrscheinlich durch Ammoniak-Verdampfung. Die Zufügung des Bikarbonates ergibt pH-Werte der aufgelösten, gefriergetrockneten Präparate, welche zwischen 6 und 8 liegen. Die angewandten Techniken (Gefriertrocknen, Arbeiten unter Kohlensäure-Ausschluss, Mahlen der gefriergetrockneten Präparate, Abfüllen der Präparate in Polyethylensachets, etc.) wurden bereits in unseren früheren Publikationen ausführlich beschrieben (10, 11).

AP-Aktivitätsbestimmung

Durch die Einwirkung von AP auf p-Nitrophenylphosphat (14) entsteht p–Nitrophenol, dessen Konzentration spektrofotometrisch bei 405 nm gemessen werden kann. Die Konzentrationszunahme in Funktion der Zeit dient dann zur Aktivitätsbestimmung. Um genaue und reproduzierbare Messwerte zu erhalten, müssen die Konzentrationen von Puffersalz (13) und Mg-Ionen (5) sorgfältig standardisiert sein. Wie BRESTKIN et al. (14) haben auch wir gefunden, dass reproduzierbare Aktivitäten nur gemessen werden können, wenn Puffer und Enzym vorinkubiert werden. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache wurde die folgende Arbeitsvorschrift entwickelt:
In eine 2 cm-Glasküvette werden nacheinander 5 ml Enzymlösung und 3 ml 0,6 M Ammediol-0,003 M $MgCl_2$-Lösung (pH 10,15) pipettiert, gut gemischt und während 15 Min. bei 25°C vorinkubiert. Hierauf wird 1 ml 0,09 M p-Nitrophenylphosphat zugefügt. Die Zunahme der Extinktion wird als Mass der Enzymaktivität registriert. In unserem Fall benützten wir einen Zeiss PMQ II, der mit einem thermostatisierten Küvettenhalter und Rührküvetten ausgerüstet und mit einem Servogor-Kompensationsschreiber (Goertz) verbunden ist. Die folgenden Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung gebraucht: Ammediol (2-amino, 2-methylpropandiol-1,3, rein, Koch Light Labs Ltd., England), $MgCl_2$ (p. a., Merck) und p-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz (p. a. Merck).

Resultate

Wasseraufnahme der Systeme

Der Wassergehalt der AP-Polymer-Systeme wurde mittels KF-Titration nach Inkubation bei verschiedenen relativen Luftfeuchtigkeiten (r. L.) über gesättigten Salzlösungen bestimmt. Es war kein Unterschied zwischen den "konzentrierten" und "verdünnten" Modellen festzustellen, so dass

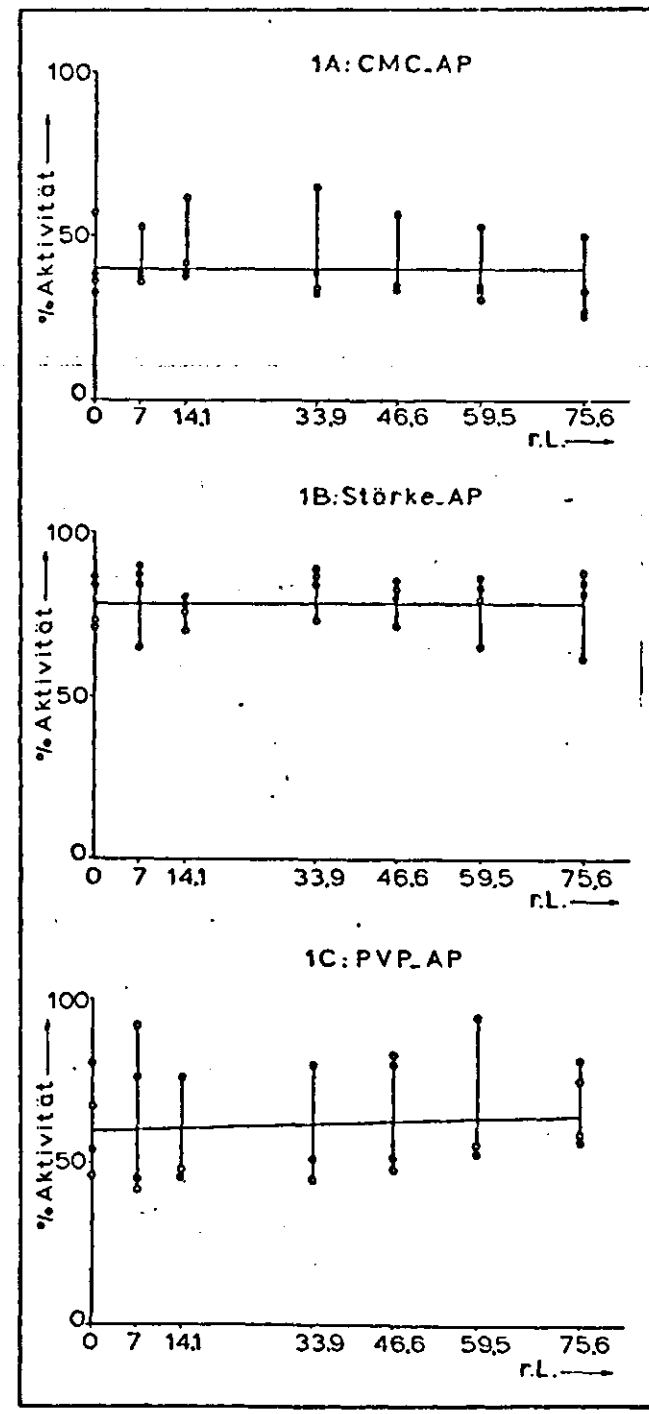


Abb. 1 Restaktivität von alkalischer Phosphatase nach 2 Wochen Inkubation bei verschiedenen Wasseraktivitäten in % der "eingewogenen" Aktivität (●: verdünntes Modell und ○: konzentriertes Modell).

in Tab. 1 die Resultate nicht nach Enzymgehalt der Modelle differenziert sind. Wie bei den früher beschriebenen Systemen mit Peroxydase (11) und Pektinmethylesterase (15) ist auch bei der AP wiederum zu beobachten, dass bei r. L. = 75,6 % das System mit CMC klebrig und das System mit löslicher Stärke hart wird, während PVP zerfliesst.

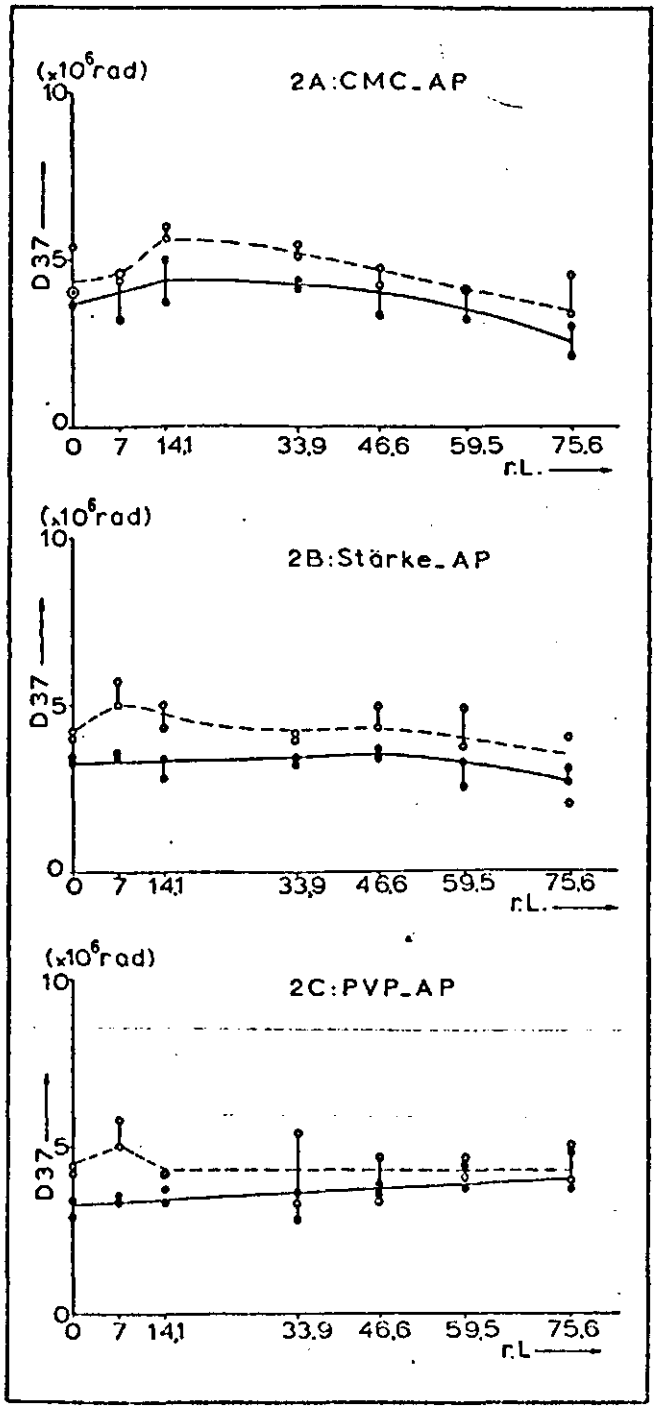
Lagerungseffekte

In Abb. 1 sind die Restaktivitäten nach 14tägiger Inkubation bei verschiedenen r. L.-Werten in % der eingewogenen Aktivität wiedergegeben. Die Streuung der Resultate lässt keine deutlichen Schlussfolgerungen über den Einfluss der r. L. zu. Auch ist kein Einfluss der Höhe der Beginnaktivität

Tab. 1 Wassergehalte in % des Gesamtgewichtes der gefriergetrockneten Modellsysteme nach 2 Wochen Inkubation über Silikagel und gesättigten Salzlösungen bei 2°C

Salze	% r.L.	CMC	lösliche Stärke	PVP
Silikagel	0	3	2	2,5
$NaOH \cdot H_2O$	7	6	4,5	5,5
$LiCl \cdot 2H_2O$	14,1	8,5	5,5	8
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	33,9	13	8,5	13,5
$NaJ \cdot 2H_2O$	46,6	15,5	9,5	17
$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	59,5	20	10,5	23
NaCl	75,6	29,5	14	30,5

Abb. 2 Bestrahlungsempfindlichkeit von alkalischer Phosphatase bei verschiedenen Wasseraktivitäten. (●——●: verdünntes Modell und ○——○: konzentriertes Modell).



Tab. 2 Die "innere" Strahlungsempfindlichkeit (I.S.) von alkalischer Phosphatase mit verschiedenen Polymeren bei verschiedenen Wassergehalten ($\frac{1}{E_k}$).

V = "verdünntes Modell"; k = "konzentriertes Modell".

System		Regressionsgleichung	Korrelationskoeffizient	Reziproker Richtungskoeff. (= I.S.)	Verhältnis der I.S.
CMC	V	$D_{37} = 31{,}3\ E_k + 0{,}02$	0,65	0,032	1
	k	$D_{37} = 16{,}1\ E_k + 3{,}4$	0,50	0,062	1,9
Stärke	V	$D_{37} = 19{,}4\ E_k + 0{,}01$	0,70	0,052	1,6
	k	$D_{37} = 21{,}9\ E_k + 2{,}2$	0,55	0,046	1,4
PVP	V	$D_{37} = -24{,}4\ E_k + 0{,}05$	0,51	−0,041	−1,3
	k	$D_{37} = -15{,}4\ E_k + 5{,}1$	0,33	−0,065	−2,0

zu erkennen. Hingegen ist wiederum eine deutliche Abhängigkeit der Lagerstabilität vom Polymeren zu sehen. Am stabilsten ist AP auf löslicher Stärke (durchschnittlich 80 % Restaktivität) und am wenigsten stabil auf CMC (durchschnittlich 40 % Restaktivität). Dazwischen liegt das System mit PVP mit etwa 60 % Restaktivität. Nach Auflösen in Wasser sinkt die Aktivität aller Modelle um ungefähr 10 % per Woche (Kühlschrank; 2–5°C).

Bestrahlungseffekte

Die Bestrahlungsempfindlichkeit eines Enzymes ist dem sog. D_{37}-Wert umgekehrt proportional. Dieser Wert wird aus der linearen Regression der natürlichen Logarithmen der Restaktivitäten als Funktion der Dosis berechnet und gibt also an, bei welcher Dosis die Aktivität auf 37 % der Ausgangsaktivität abgesunken ist. Ähnlich wie beim System CMC-Peroxydase (12) schneiden die experimentell bestimmten Regressionsgeraden die Aktivität-Ordinate dicht beim Punkt $\ln A_0$, welcher die Aktivität des unbestrahlten Musters angibt. In **Abb. 2** sind die D_{37}-Werte der untersuchten AP-Polymer-Systeme für verschiedene r. L.-Werte aufgezeichnet. Hierbei ist nun ein deutlicher Einfluss der Enzymkonzentration zu sehen, wobei allerdings bei einer 20fachen Enzymkonzentration die D_{37}-Werte durchschnittlich um ca. 25 % ansteigen. Das Modell CMC-AP (**Abb. 2A**) weist für beide Enzymkonzentrationen die grösste Strahlungsempfindlichkeit bei r. L. = 75,6 % auf und die geringste bei r. L. = 14,1 %. Die Kurven für das "konzentrierte" und das "verdünnte" Modell löslicher Stärke-AP (**Abb. 2B**) sind flach bis hinauf zu 46,6 %, wonach ein geringes Abfallen eintritt. Mit PVP als Träger ist das Verhalten bei den zwei Enzymkonzentrationen verschieden (**Abb. 2C**). Das "verdünnte Modell" zeigt zunehmende D_{37}-Werte (abnehmende Empfindlichkeit) bei zunehmenden r. L., während beim "konzentrierten Modell" keine Veränderung der Empfindlichkeit über das ganze r. L.-Gebiet festzustellen ist.

"Innere" Bestrahlungsempfindlichkeit

Ähnlich wie für die Modelle mit Peroxydase (12) wurde wiederum die "innere" Bestrahlungsempfindlichkeit (intrinsic radio-sensitivity) aus der Kurve $D_{37} = f$ (Enzymkonzentration) berechnet. Die "intrinsic radiosensitivity" ist dann der reziproke Wert der Neigung dieser Kurve. Als Enzymkonzentration dient die reziproke Feuchtigkeit ab

Tab. 3A Nacheffekt ausgedrückt durch die D_{37}-Werte ($\times 10^{-6}$ rad) bei verschiedenen Wasseraktivitäten.

D_{37} = berechnet aus den Restaktivitäten nach Bestrahlen, Auflösen und einer Nacht stehen.
D'_{37} = berechnet aus den Restaktivitäten nach Bestrahlen, Auflösen und 7 Tagen bei 2–5°C stehen.

r.L. während der Bestrahlung	"verdünntes Modell"						"konzentriertes Modell"					
	CMC		lösl. Stärke		PVP		CMC		lösl. Stärke		PVP	
	D_{37}	D'_{37}	D_{37}	D'_{37}	D_{37}	D'_{37}	D_{37}	D'_{37}	D_{37}	D'_{37}	D_{37}	D'_{37}
0	3,8	2,8	3,3	2,5	3,1	3,1	5,7	3,9	4,1	4,0	4,3	3,8
7	3,9	3,7	3,5	2,7	3,4	3,7	4,5	4,2	5,2	4,8	5,3	4,3
14,1	4,3	3,4	3,1	2,0	3,5	3,8	5,8	4,8	4,6	4,3	4,2	4,6
33,9	4,2	3,1	3,3	2,9	3,2	3,7	5,2	4,5	4,0	4,4	4,4	4,2
46,6	4,0	3,0	3,5	2,5	3,8	3,6	4,4	4,2	4,6	4,4	4,1	4,0
59,5	3,6	2,8	2,8	2,1	4,2	3,9	4,1	3,8	4,2	3,7	4,4	5,2
75,6	2,5	2,1	2,9	2,3	4,4	5,1	4,0	3,5	2,9	2,7	4,6	4,0

Tab. 3B Nacheffekt in % in den wässrigen Lösungen der bestrahlten Modelle nach einer Woche Inkubation bei 2–5°C. Nacheffekt = $\frac{D_{37} - D'_{37}}{D_{37}} \cdot 100\,\%$

r.L. während der Bestrahlung	"verdünntes Modell" CMC	Stärke	"konzentriertes Modell" CMC
0	26	24	31
7	5	23	6
14,1	21	35	17
33,9	26	12	13
46,6	25	29	5
59,5	22	25	7
75,6	16	21	13

Tab. 4 Die pH-Senkung im AP-Stärke-System als Funktion der Bestrahlungsdosis (D). Für jeden r.L.-Wert sind die Resultate von 2 verschiedenen Versuchsserien ausgewertet.

r.L. während der Bestrahlung	Regressionsgleichung	Korrelationskoeffizient	Mittelwerte des pH unbestrahlt	Durchschnittl. pH-S. per 10^6 rad.
0	pH = –0,08D + 7,3	0,9561	7,3	0,05
	pH = –0,02D + 7,4	0,9118		
7	pH = –0,09D + 7,3	0,8538	7,5	0,08
	pH = –0,08D + 7,7	0,9693		
14,1	pH = –0,07D + 7,3	0,9891	7,4	0,07
	pH = –0,08D + 7,6	0,9051		
33,9	pH = –0,10D + 7,2	0,9886	7,4	0,09
	pH = –0,09D + 7,6	0,9488		
46,6	pH = –0,08D + 7,3	0,8226	7,4	0,09
	pH = –0,10D + 7,5	0,9488		
59,5	pH = –0,14D + 7,1	0,9585	7,1	0,10
	pH = –0,06D + 7,2	0,9175		
75,6	pH = –0,18D + 6,2	0,9666	6,5	0,10
	pH = –0,03D + 6,9	0,8499		

r. L. = 46,6 %, unter der Annahme, dass dann freies Wasser vorliegt. Aus Tab. 2 ist ersichtlich, dass bei allerdings schlechter Korrelation die Werte für die Systeme mit CMC und Stärke innerhalb dem Verhältnis 1 : 2 bleiben. Es ist fraglich, ob bei den negativen Werten mit PVP das Konzept dieses Empfindlichkeitsmasses (16) noch angewandt werden kann.

Nach-Effekt

Wie für die Modelle mit Peroxydase (12) interessierte uns auch für die Modelle mit AP, ob und in welcher Grösse ein Nacheffekt beim Stehenlassen von Lösungen der bestrahlten Modelle auftritt. Die nach einer Nacht und nach einer Woche stehen (2–5°C) bestimmten D_{37}-Werte (Mittel von Doppelbestimmungen) sind in Tab. 3A wiedergegeben. Es ist auf den ersten Blick ersichtlich, dass mit PVP als Trägermaterial von einem Nacheffekt nicht gesprochen werden kann. Dies gilt auch für das "konzentrierte Modell" löslicher Stärke-AP. Für die anderen Modelle sind die Nacheffekte in % berechnet in Tab. 3B zusammengestellt. Es zeigt sich, dass der Nacheffekt bei geringerer Enzymkonzentration grösser ist, nämlich 20–30 % für die "verdünnten" CMC- und Stärke-Modelle, verglichen mit 10–15 % für das "konzentrierte" CMC-Modell und einem nur zweifelhaften Effekt beim "konzentrierten" Stärke-Modell.

pH-Veränderungen

Kontrollmessungen ergaben im System löslicher Stärke-AP eine pH-Erniedrigung von ca. 0,07 Einheiten per 10^6 rad. In Tab. 4 sind die Messwerte von je 2 Versuchsserien pro r. L.-Wert ausgewertet, wobei ab r. L. = 46,6 % die Unterschiede von Serie zu Serie trotz genau gleicher Arbeitsweise zunehmen.

Diskussion

Die in Tab. 1 publizierten Gleichgewichtswassergehalte stimmen nicht genau mit den früher gefundenen Werten für die Systeme mit Peroxydase und Pektinmethylesterase überein (12, 15). Allerdings ist zu bedenken, dass die Modelle jedesmal mit anderen (Pektinmethylesterase) oder ohne Salze (Peroxydase) vorliegen und dass ferner als Trocknungsmittel für r. L. = 0 % P_2O_5 durch Silicagel ersetzt wurde.

Die von uns gekauften und hergestellten Lösungen von AP wiesen pH 6 und einen hohen Gehalt (3,2 M) an Ammoniumsulfat auf. Dies verleiht ihnen einen hohen Grad von Stabilität, die Lösungen verloren beim Stehen im Kühlschrank (2–5°C) monatelang nicht an Aktivität. Bei geringen Salzkonzentrationen kann hingegen die Aktivität schon innert einer Woche auf 30 % abfallen. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, verloren unsere Modelle, obwohl sie im Vergleich mit den Vorratslösungen viel salzärmer sind, innert 3 Wochen lediglich 20–60 % Aktivität. Man muss also annehmen, dass die AP durch Komplexbildung mit den Polymeren stabilisiert wird. Dies bedeutet auch, dass die in dieser Arbeit gemessenen Bestrahlungsempfindlichkeiten den Enzym-Polymer-Komplex betreffen. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass die Inaktivierungskurven (Regressionsgeraden der Restaktivitäten nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen) die Aktivitätsordinate nahe beim Punkt ln A_0 (Ausgangsaktivität) schneiden, ein Phänomen, welches nur aus der Gleichwertigkeit aller bestrahlten Enzymmoleküle erklärbar ist.

In den Systemen mit CMC und mit löslicher Stärke nimmt die Bestrahlungsempfindlichkeit der AP bei r. L. > 46,6 % (freies Wasser !) mit steigenden r. L.-Werten zu. Das System mit PVP verhält sich gerade umgekehrt, wie aus Abb. 2C und den negativen Werten für die "innere" Bestrahlungsempfindlichkeit (Tab. 2) ersichtlich ist. Um dies zu erklären, kann man die folgende Empfindlichkeitsreihe gegenüber Radikalen und hydratisierten Elektronen postulieren: Stärke = CMC < AP < PVP, wobei Polymere und Enzym als Systemkomponenten aufzufassen sind. Tatsächlich muss nach HART et al. (17) die Reaktivität von hydratisierten Elektronen gegenüber PVP viel grösser sein als gegenüber Kohlenhydraten.

Die "konzentrierten Modelle" hatten höhere D_{37}-Werte (Abb. 2) und geringere Nacheffekte (Tab. 3B). Die AP ist also dann besser geschützt als in den "verdünnten Modellen" mit geringerem Enzymgehalt. Dies kann unter anderem eine Folge einer höheren Konzentration an beschützenden Verunreinigungen (18) sein, wozu auch inaktive Enzymmoleküle gerechnet werden können.

Dank

Wir danken F. H. Joosten, H. Hessels und H. Stegeman für die sorgfältige Ausführung vieler Messungen. Die Bestrahlungen wurden wiederum mit der geschätzten Hilfe der Mitarbeiter des ITAL's (Institut für die Verwendung von Atomenergie in der Landwirtschaft) ausgeführt.

Literatur

1 KLEYN, D. H. und YEN, W., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, *53*, 869 (1970)
2 COPIUS PEEREBOOM, J. W., Fette-Seifen-Anstrichm., *72*, 299 (1970)
3 PORTMANN, P., ROSSIER, R. und CHARDONNENS, H., Helv. Physiol. pharmacol. Acta, *18*, 414 (1960)
4 ENGSTRÖM, L., Biochim. Biophys. Acta, *52*, 36 (1961)
5 FERNLEY, H. N. und WALKER, P. G., Biochem. J., *104*, 1011 (1967)
6 NIKOLSKAYA, E. B., Radiobiologiya, *8*, 192 (1968)
7 LINEWEAVER, H. und BURK, D., J. Am. Chem. Soc., *56*, 658 (1934)
8 HANDOLL, P. J., ROTBLAT, J., WILLS, E. D. und WORMALL, A., Nature, *178*, 307 (1956)
9 AKIYA, T., MADSON, T. H. und CHIPAULT, J. R., Lipids, *4*, 398 (1969)
10 ROOZEN, J. P. und PILNIK, W., Lebensm.-Wiss. u. Technol., *4*, 24 (1971)
11 ROOZEN, J. P. und PILNIK, W., Lebensm.-Wiss. u. Technol., *3*, 37 (1970)
12 ROOZEN, J.P. und PILNIK, W., Lebensm.-Wiss. u. Technol., *4*, 93 (1971)
13 GOMORI, G., Biochim. Biophys. Acta, *8*, 162 (1952)
14 BRESTKIN, A. P., NIKOLSKAYA, E. B. und KARPENKO, N. B., Biochemistry (USSR), *32*, 214 (1967)
15 ROOZEN, J.P. und PILNIK, W., Lebensm.-Wiss. u. Technol., *4*, 158 (1971)
16 SANNER, T. und PIHL, A., Radiat. Res., *19*, 12 (1963)
17 HART, E. J., THOMAS, J. K. und GORDON, S., Radiat. Res., *Suppl. 4*, 74 (1964)
18 FLETCHER, G. und OKADA, S., Radiat. Res., *11*, 291 (1959)

Über die Stabilität adsorbierter Enzyme in wasserarmen Systemen.

VI. Möglichkeiten zur Inaktivierung von Enzymen in getrockneten Lebensmitteln durch Bestrahlung . Betrachtungen im lichte der Literatur und eigener Untersuchungen.

J.P. ROOZEN und W. PILNIK
Landwirtschaftliche Hochschule, Abteilung für Lebensmittelwissenschaft, Wageningen, Niederlande.

Einleitung und Grundlagen

Enzymaktivität in getrockneten Lebensmitteln

Getrocknete Lebensmittel stehen im hygroskopischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung. Für eine grosse Anzahl ist die Sorptionsisotherme bestimmt; meist handelt es sich um sigmoïde Kurven (12). Die Abhänglichkeit von Enzymaktivitäten vom Wassergehalt des getrockneten Lebensmittels haben als erste Kiermeier und Coduro (3) am Beispiel des diastatischen Abbaues von Stärke untersucht. Acker (4) und Matheson (5) betrachteten enzymatische Reaktionen als Funktion der relativen Luftfeuchtigkeit (r.L.) Als Mass für die Enzymaktivität diente dabei das Entstehen von Reaktionsprodukten in einer Mischung des getrockneten Lebensmittels mit Substrat. Acker und Huber (6) machten auch Modellversuche, indem sie gereinigte Enzympräparate mit einem Träger gefriertrockneten und mit dem Substrat in trockener Form mischten. Acker und Lück (7) konnten das Fortschreiten der enzymatischen Umsetzungen als Funktion der r.L. darstellen, wobei dieselben unterhalb des Wendepunktes der Sorptionsisotherme nicht mehr oder nur sehr unvollständig verliefen. Ihre Erklärung hierfür ist die Anwesenheit von freiem Wasser im Systemen mit einer r.L. oberhalb des Wendepunktes (8). Dieses befindet sich hauptsächlich in den Kapillaren und dient als Transportmittel für Substratmoleküle, wodurch dann enzymatische Umsetzungen möglich werden (9). Interessant ist, dass lipolytische Reaktionen auch unterhalb des Wendepunktes der Sorptionsisotherme statt finden, z.B. in gemahlenem Hafer. Acker und Beutler (10) erklären dies dadurch, dass in diesem Fall das Substrat keiner Auflösung in Wasser bedarf, um zu den Enzymmolekülen zu gelangen. Ihre schönen Experimente mit festem (Trilaurin) und flüssigem (Triolein) Substrat bestätigen diese Erklärung. Aus dem oben gesagten wird deutlich,

warum auch in getrockneten Lebensmittel Enzymaktivitäten zu Qualitätsproblemen führen können. Die Lagerung bei entsprechend tiefen r.L. ist aus technologischen Gründen nicht immer realisierbar; auch kann sie zu anderen ebenfalls unerwünschten Umsetzungen führen (Fettoxydation,2,11). Darum muss z.B. Trockengemüse aus blanchierten Gemüsen hergestellt werden. Eine Inaktivierung von Enzymen durch Bestrahlung des Trockenproduktes würde interessante lebensmitteltechnologische Perpektiven eröffnen.

Übertragung von Bestrahlungsenergie in Lebensmitteln

Lebensmittel werden entweder mit Elektronen oder mit Gamma-Strahlen bestrahlt. In beiden Fällen beobachtet man den sog. direkten Effekt, der durch nicht-elastische Zusammenstösse zwischen energiereichen und molekülgebundenen Elektronen zustande kommt und das Entstehen von angeregten Molekulen sowie von negativen und positiven Ionen bewirkt. Am Wassermolekülen entstehen auch ungeladene Radikale und hydratisierte Elektronen (12). Diese aktiven Teilchen reagieren wieder mit den anderen Molekülen: dies ist dann der indirekte Effekt. Direkter und indirekter Effekt wurden z.B. von Alexander et al (13) bei der Bestrahlung von Eiweissen studiert. Ein dritter Mechanismus der Energieübertragung (mittels angeregter Moleküle) wurde z.B. von Norman und Ginoza (14) an einem Gemisch von Cystein und Alanin aufgezeigt. Dieses Mechanismus scheint auch bei den Versuchen von Sanner et al (15) wirksam zu sein, wobei ein Makromolekül durch die Anwesenheit der Penicillamin vor Abbau beschützt wird. Solche Schutzmechanismen kommen auch bei indirekten (16, 17, 18, 19) und direkten Bestrahlungseffekten (20) häufig vor.

Enzym-Polymer Systeme als Modelle für getrocknete Lebensmittel.

Unsere Systeme wurden durch gefriertrocknen von Peroxydase, alkalischer Phosphatase und Pektinesterase mit Carboxymethylcellulose (CMC), löslicher Stärke, Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Natrium-Pektat (NaP) erhalten. Die genannten Polymere wurden gewählt, weil sie nach gefriertrocknen in Wasser instant löslich sind, wodurch die Messung der Enzymaktivitäten beträchtlich vereinfacht wird und weil sie als Modelle für Grundbausteine von Lebensmitteln gelten können. Ionisierende Strahlen bewirken in Polymeren Depolymerisation und/oder Vernetzung, wobei direkte und indirekte Effekte verschiedene Wirkungen haben können (21). Bacq und Alexander (22)

unterscheiden zwischen "Abbautypen", welche bei Bestrahlung in trockenem oder gelöstem Zustand depolymerisieren und "Vernetzungstypen", welche bei hoher Konzentration Vernetzungsreaktionen untergehen, in verdünnten lösung aber depolymerisieren. Die von uns benützte CMC gehört zu den Abbautypen (22) - nur bei bestimmten Wassergehalten ist Vernetzung beschrieben (23). Stärke wird ebenfalls hauptsächlich abgebaut (24, 25, 26), wo bei der Einfluss des Wassergehaltes von Reuschl und Guilbot (27) beschrieben wurde. Auch Pektin gehört zum Abbautypus (28); auch hier ist die Bestrahlungsempfindlichkeit eine Funktion des Wassergehaltes (29). PVP ist ein Repräsentant des Vernetzungstypus (30, 31): 1 - 2 % ige Lösungen gelieren beim Bestrahlen. Auch für die Wahl der Enzyme war die Einfachheit der Aktivitätsmessungen wichtig. Andere Kriterien waren: Bedeutung in Lebensmitteln, Erhältlichkeit in reiner Form, Verschiedenheit im Typus zum Studium eines möglichen Zusammenhanges zwischen Molekülbau (Molekulargewicht, prosthetische Gruppe, gebundene Metallionen) und Bestrahlungsinaktivierung. So ist z.B. der Einfluss von ionisierenden Strahlen auf alkalische Phosphatase zu vergleichen mit der Wirkung eines nicht kompetitiven Inhibitors (32). Dies bedeutet dass Enzymmoleküle durch Bestrahlung vollständig inaktiviert werden, ohne dass Zwischenformen entstehen. Bei Lactoperoxidase (33) andererseits sind sowohl der Eiweissteil als die prosthetische Gruppe strahlungsempfindlich, sodass verschiedene Veränderungen des Moleküles zur Inaktivierung der Peroxidase beitragen können.

Gemessene Grössen und Definitionen

Die Einstellung der Präparate auf eine bestimmte Feuchtigkeit erheischte eine gewisse Lagerzeit vor der Behandlung. Dabei wurde ein Aktivitätsverlust festgestellt: Es konnte also eine Lagerstabilität bestimmt werden. Die Aktivität der Enzyme nach Bestrahlung wurde in % der Aktivität direkt vor Bestrahlung als Funktion der Dosis ausgedrückt. In den von uns untersuchten Systemen handelte es sich dabei um eine Exponentialfunktion; dies erlaubte sog. D_{37}-Werte als Mass für die Bestrahlungsempfindlichkeit resp. resistenz zu gebrauchen. Der D_{37}-Wert ist die Dosis die nötig ist um 37 % Restaktivität zu erhalten. Nach einer Woche stehen der Lösungen im Eisschrank wurde dieser Wert jeweils nochmals bestimmt und D'_{37} genannt. Aus beiden Werten kann dann der sog. Nacheffekt in % als

$$\frac{D_{37} - D'_{37}}{D_{37}} \cdot 100$$

berechnet werden. Als allgemeine nicht von der Feuchtigkeit abhängige Strahlungsempfindlichkeit der Enzym-Polymer Systeme wird die "innere" Strahlungsempfindlichkei

gewählt. Dazu werden die Systeme mit freiem Wasser/konzentrierte Lösungen betrachtet, da bei der Bestrahlung das freie Wasser bereits Radikale zu bilden vermag. Zur Berechnung dieser Grösse nach Sanner und Pihl (34) wird der reziproke Wert des Wassergehaltes als Enzymkonzentration genommen. Die "innere" Strahlungsempfindlichkeit ist dann der reziproke Wert der Neigung der Kurve der D_{37}-Werte als Funktion dieser Konzentration.

Betrachtungen und Diskussion

Inaktivierung von Enzymen durch Bestrahlung

Nach einem ausführlichen Übersichtsreferaat von Augenstine (35) können folgende Prozesse zur Inaktivierung führen:

1) Veränderungen an den Aminosäuren des aktiven Zentrums.
2) Spaltung covalenter Bindungen.
3) Formung freier Radikale.
4) Gleichzeitige Spaltung vieler schwacher polarer Bindungen.
5) Lokale Aufhäufung von Energie.

Die Bestrahlungsinaktivierung von Enzymen ist meistens eine Exponentialfunktion der Dosis. Papain ist eine Ausnahme. Dies wird von Sanner und Pihl (34) durch eine allgemeine kinetische Theorie erklärt für Experimente, bei welchen die Bestrahlungsdauer die mittlere Lebzeit von Wasserradikalen übersteigt (36). Auch bei α-Amylase-lösungen ist die Funktion Dosis-Restaktivität nicht exponentiell (37); dafür werden zwei Erklärungen gegeben: verschiedene Reaktionsschnellheiten von Wasserradikalen mit verschiedenen Aminosäuren des Enzymes oder Denaturierung von inaktivierten Enzymmolekülen, wodurch sie für Wasserradikale unzugänglich werden. Ohne Angaben über die Inaktivierungskinetik werden zur Inaktivierung von Lysozyme (38) 3 mögliche Mechanismen angeführt: Abdeckung des aktiven Zentrums durch Aggregation, Spaltung covalenter Bindungen am aktiven Zentrum, allgemeiner Abbau des Lysozym-moleküles. Bei Phosphorylase B (39) ist die allosterische Funktion strahlungsempfindlicher als die katalytische. Sie kann auch beschützt werden durch eine Fixierung der SH-Gruppen mit p-Chlormercuribenzoat. Das System, in welchem ein Enzym bestrahlt wird, hat einen straken Einfluss auf das Mass der Inaktivierung. So sind Enzyme in Lebensmitteln ziemlich bestrahlungsbeständig (40) und nehmen mit zunehmende Reinigung an Empfindlichkeit zu (41, 42, 43). Dies ist vor allem auf die Verminderung der Bestrahlungsempfindlichkeit durch Adsorption (44) resp. Komplexformung zurückzuführen. Komplexe können in der Form von Metall-chelaten auftreten (Carboxypeptidase A mit Cystein,

45; Katalase mit Glyzerin, 46 oder Blausäure, 47). Auch Enzym-Substrat Komplexe sind untersucht: DNA-DNase (48), Polyphenoloxidase-Tyrosin (49), Actomyosin-Adenosintriphosphat (49). Ein Beispiel eines kovalent gebundenes Enzym ist Papaïn mit Poly-p-aminophenylalanin (50). Auch nicht weiter spezifizierte Komplexe wurden beschrieben z.B. Agar-Trypsin (51).

Möglichkeiten der Inaktivierung von Enzymen in trockenen Lebensmitteln

Der Zustand, in welchem ein Enzym vorliegt, entscheidet über die Art der Übertragung der Bestrahlungsenergie und damit über das Mass der Inaktivierung. Die in unseren vorhergehenden Publikationen (52, 53, 54, 55, 56) ausführlich beschriebenen eigenen Resultate sind schematisiert in Tab.1. Die durch uns untersuchten Enzyme wiesen je nach Feuchtigkeit und Art des polymeren Trägers eine sehr unterschiedliche Bestrahlungsempfindlichkeit auf. Man kann sagen dass die Möglichkeiten der Energieübertragung durch den Wassergehalt gegeben sind, wobei die Eigenschaften der Polymeren ein weiterer mitbestimmender Faktor sind bei der Umsetzung von Bestrahlungsenergie in inaktivierte Enzymmoleküle. Ferner ist zu bemerken, dass die r.L.-D_{37} Kurven der Peroxidase-Polymer Systeme bei tieferen pH Werten tiefer liegen; das Enzym ist dabei offensichtlich bestrahlungsempfindlicher (54). Ebenfalls interessant ist die Tatsache, dass eine Konzentrationserhöhung der alkalischen Phosphatase im System alkalische Phosphatase-Polymer höher liegende r.L.-D_{37} Kurven ergibt (55). Die Bestrahlungsempfindlichkeit dieses Enzymes nimmt also mit Konzentrationszunahme ab. In beiden Fällen sind die r.L.-D_{37} Kurven lediglich parallel verschoben. Dies weist auf eine gewisse Allgemeingültigkeit der in Tabelle 1 gegebenen Charakterisierung der r.L.-D_{37} Kurven. Die Grenze sensorischen "Acceptability" von bestrahltem, getrocknetem Gemüse ist 1.10^6-3.10^6 rad (57,58). Selbst bei Dosen bis 17.10^6 rad konnte aber de Koe (57) noch Peroxidase-Aktivität feststellen. Daraus muss man schliessen, dass bei der Inaktivierungsdosis kein geniessbares Produkt mehr vorliegen würde. Die Trockengemüse, mit welchen de Koe arbeitete, hatten einen Wassergehalt von 3,5 - 8%. Bei höheren Feuchtigkeiten (r.L. $>$ 45%) wäre die Peroxidase empfindlicher gegen Bestrahlung gewesen (54). Allerdings können dabei auch Stoffe, welche sensorisch ungewünschte Abbauprodukte ergeben, bestrahlungsempfindlicher werden.

Vor- und Nacheffekte

Unsere Studien haben gezeigt dass schon allein durch Aufbewahren der getrockneten Enzym-Polymer Systeme Aktivitätsverluste auftreten. Bei Peroxidase ist die Lagerstabilität stark vom pH, der Temperatur und dem r.L.-Wert abhängig (52, 53). Zufügung des Substrates Guajacol erhöht die Lagerstabilität (52). Anderesseits ist keine erhöhte stabilität des Pektinesterase-Na-Pektat Systemes gegenüber anderen Pektinesterase-Polymer Systemen festzustellen (55). Im gegensatz zur Bestrahlung spielt bei der Lagerung die Konzentration der alkalischen Phosphatase keine Rolle (56). Verallgemeinend kann aus Tab. 1 geschlossen werden, dass die Eigenschaften der Enzyme und der Polymeren für die Lagereigenschaften bestimmend sind: Peroxidase und alkalische Phosphatse sind im Stärke-System am stabilsten, während Pektinesterase im CMC System am stabilsten ist. Lösungen der Enzym-Polymer Systeme welche nach der Bestrahlung gemacht und gelagert werden, weisen weitere, unterschiedliche Aktivitätsverluste auf, mit einer gewissen Abhängigkeit von der Ursprünglichen Dosis. Dieselben betragen für Peroxidase und alkalische Phosphatase etwa 10 %, gegenüber 25 - 60 % für Pektinesterase. Es gibt also einen Nacheffekt d.h. ein Andauern von Inaktivierungsreaktionen. Daniels et al (59) erklärten einen solchen Nacheffekt für DNA-Lösungen mit einen langsamen Hydrolyse von labilen Zwischenprodukten. Wenn wir diese Erklärung auf die von uns beobachteten Nacheffekte (Tab. 1) anwenden, müssen wir das Entstehen von zwar aktiven, aber doch "angeschlagenen" Enzymmolekülen postulieren, welche dann in Lösung ihre Aktivität verschnellt verlieren. In den PVP Systemen ist kein Nacheffekt zu beobachten; entweder entstehen darin also keine "angeschlagene" Enzymmoleküle oder dieselben werden wieder stabilisiert. Auch bei Pektinesterase tritt in keinem der Polymer Systeme (Tab. 1) ein Nacheffekt auf. Vielleicht kommt dieser auch angesichts der hohen Aktivitätsverluste beim Stehenlassen nach der Bestrahlung nicht mehr zur Geltung (55).

Allgemeine Rückschlüsse auf nicht untersuchte Enzyme

In den vorliegenden Arbeiten konnten nur einige Enzyme untersucht werden; können daraus Schlüsse gezogen werden in Bezug auf andere Enzyme?

Die Betrachtung der I.S.-Werte auf Tab. 1 ergibt für die Stärke und CMC Systeme die folgende Rangordnung der Bestrahlungsempfindlichkeit: Pektinesterase < Peroxidase < alkalische Phosphatase. Dies ist auch die Rangordnung der Molekulargewichte (60, 61) dieser Enzyme. Am einer Regression erster oder zweiter Ordnung (Abb. 1) wäre mit der gebotenen Vorsicht die Schlussfolgerung zu ziehen, dass die Bestrahlungsempfindlichkeit von Enzymen auch vom Molekulargewicht abhängt. Nach Okada (48) steigen mit dem Molekulargewicht eines Eiweissmolekules auch die Anzahl reaktiver stellen. Setzen wir reaktive Stelle gleich potentiellem Inaktivierungsplatz, so nimmt tatsächlich die Bestrahlungsempfindlichkeit mit dem Molekulargewicht zu. Dies wurde auch beim direkten Bestrahlungseffekt festgestellt (35). Allerdings "passen" die I.S.-Werte des Na-Pektat und der PVP Systeme nicht. Beim Na-Pektat kann dies durch seinen Charakter als Substrat bedingt sein. Bei den PVP Systemen kann die Anwesenheit nicht aromatischer C=O Gruppen als Erklärung dienen, welche nach Hart et al (12) eher mit hydratisierten Elektronen reagieren als die Aminosäuren eines Enzymmolekules.

Tab. 1:

Schematische Übersicht über die Resultate der Lagerungs- und Bestrahlungsversuche an Enzym-Polymer Systemen.
pH 6-8, 2°C, Elektronen bis 6.10^6 rad.

I Verlauf der Kurve % Restaktivität vs Zunehmende r.L.
II Verlauf der Kurve Strahlungsresistenz (D_{37}) vs zunehmende r.L.
III Verhältnisse der "inneren" Bestrahlungsempfindlichkeiten
IV Nacheffekte.

System	I	II	III	IV
Peroxydase				
- CMC	Minimum	Maximum	3	~ 40 %
- Stärke	Horizontal	Sinkend	4	~ 50 %
- PVP	Minimum	Maximum	2	kein
Pektinesterase				
- CMC	Sinkend	Maximum	2	kein
- Stärke	Sinkend	Maximum	2	kein
- PVP	Horizontal	Steigend	-	kein
- Na-pektat	Horizontal	Maximum	1	kein
Alkalische Phosphatase				
- CMC	Horizontal	Maximum	3	~ 25 %
- Stärke	Horizontal	Maximum	5	~ 30 %
- PVP	Horizontal	Steigend	-4	kein

Abb. 1. Regressionen erster (—) und zweiter (- - -) Ordnung der "inneren" Strahlungsempfindlichkeit (I.S.) als Funktion des Molekulargewichtes (M.G.) der bestrahlten Enzyme (Wang Computer Modell 700).

+ Stärke als Träger

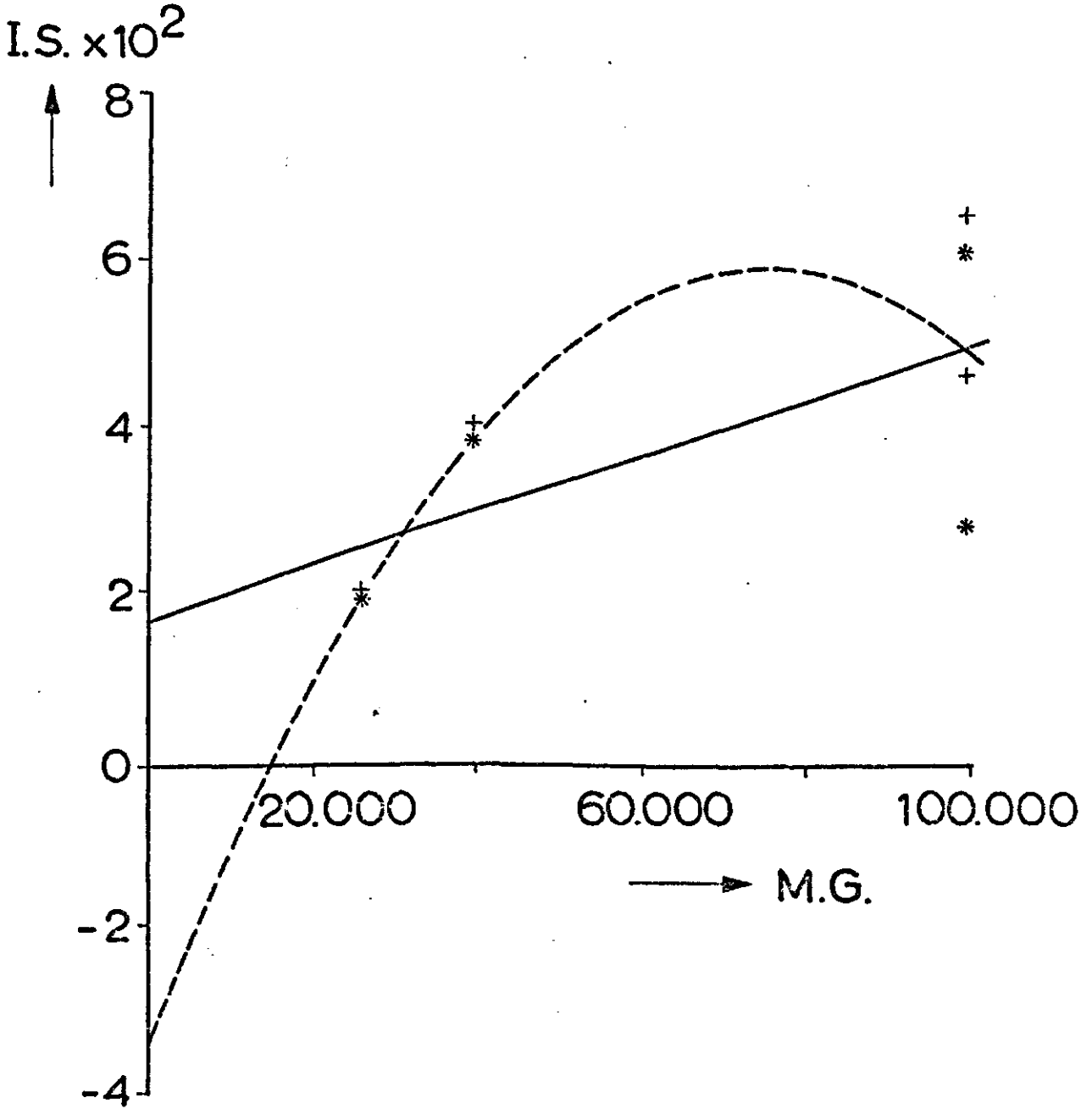
* CMC als Träger

Molekulargewichte:

Pektinesterase 26300 (61)

Peroxidase 40000 (60)

Alkalische Phosphatase 100000 (60)



Literatur

1. Heiss, R., Haltbarkeit und Sorptionsverhalten wasserarmen Lebensmittel, Springer Verlag, Berlin, 1968.

2. Heiss, R. und Eichner, K. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 1, 33 (1971).

3. Kiermeier, F. und Coduro, E., Biochem. Z., 325, 280 (1954).

4. Acker, L., Adv. Food Res., 11, 263 (1962).

5. Matheson, N.A., J. Sci. Food Agric., 13, 248 (1962).

6. Acker, L. und Huber, L., Lebensm.- Wiss. u. Technol., 2, 82 (1969).

7. Acker, L. und Lück, E. , Z. Lebensmittel - Unters. u.-Forsch., 108, 256 (1958).

8. Duckworth, R.B. und Smith, G.M. , in: Recent Advances in Food Science III, Butterworth, London, 1963, p 230.

9. Acker, L. und Kaiser, H. , Z. Lebensmittel - Unters. u.-Forsch., 110, 349 (1959).

10. Acker, L. und Beutler, H.O. , Fette-Seifen-Anstrichm., 67, 430 (1965).

11. Purr, A. , Fette-Seifen-Anstrichm., 72, 725 (1970).

12. Hart, E.J., Thomas, J.K. und Gordon, S. , Radiat. Res., suppl. 4, 74 (1964).

13. Alexander, P., Fox, M., Stacey, K.A. und Rosen, D. , Nature, 178, 846 (1956).

14. Norman, A. und Ginoza, W. , Radiat. Res., 9, 77 (1958).

15. Sanner, T., Hendriksen, T. und Dihl, A. , Radiat. Res., 32, 463-474 (1967).

16. Bachofer, C.S. und Hartwig, Q.L. , Radiat. Res., 5, 528 (1956).

17. Allen, A.O., Radiat. Res., suppl. 2, 471 (1960).

18. Dale, W.M. , Radiat. Res., suppl. 2, 578 (1960).

19. Luse, R.A. , Radiat. Res., suppl. 4, 192 (1964).

20. Alexander, P. und Charlesby, A. , Nature, 173, 578 (1954).

21. Chapiro, A. , Radiat Res., suppl . 4, 179 (1964).

22. Bacq, Z.M. und Alexander, P. , Fundamentals of Radiobiology. E.L.B.S.-series, Pergamon Press Ltd, London, 1966.

23. Münzel, F. und Schenkel, J. , Radionuklide, 4, 141 (1964).

24. Fanta, G.F., Burr, R.C., Russell, C.R. und Rist, C.E. , Cereal Chem., 47, 85 (1970).

25. Samec, M. , Stärke, 12, 99 (1960).

26. Greenwood, C.T. und Mac Kenzie, S. , Stärke, 15, 444 (1963).

27. Reuschl, H. und Guilbot, A. , Stärke, 18, 73 (1966).

28. Dzamic, M.D. und Jankovic, B.R. , Intern. J. Appl. Radiat. Isotopes, 17, 561 (1966).

29. Wahba, I.J. und Massey, L.M. , J. Polymer Sci., Part A, 4, 1751 (1966).

30. Alexander, P. und Charlesby, A. , J. Polymer Sci., 23, 355 (1957).

31. Henglein, A. , Radiat. Res., 11, 446 (1959).

32. Nikolskaya, E.B. , Radiobiologiya, 8, 192 (1968).

33. Hamilton, H.B., Okada, S. und Morrison, M. , Biochim. Biophys. Acta, 23, 540 (1957).

34. Sanner, T. und Pihl, A. , Radiat. Res., 19, 12 (1963).

35. Augenstine, L.G. , Adv. Enzymol., 24, 359 (1962).

36. Sanner, T. und Pihl, A. , Eur. J. Biochem., 1, 33 (1967).

37. Gorin, G., Wang, S.F. und Seth, T.D. , Int. J. Radiat. Biol., 16, 93 (1969).

38. Stevens, C.D., Tolbert, B.M. und Bergstrom, G.R. , Radiat. Res., 42, 232 (1970).

39. Damjanovich, S., Sanner, T. und Pihl, A. , Eur. J. Biochem., 1, 347 (1967).

40. Marples, A. und Glew, G. , AERE, I/R 2726, 2 (1958).

41. Braams, R. , Radiat. Res., 12, 113 (1960).

42. Dale, W.M. , Biochem. J., 36, 80 (1942).

43. Okada, S. und Fletcher, G.L. , Radiat. Res., 30, 667 (1967).

44. Fletcher, G.L. und Okada, S. , Radiat. Res., 11, 291 (1959).

45. Fultz, E.D. , Radiat. Res., 34, 544 (1968).

46. Lohman, W., Moss, A.J., Perkins, W.H. und Fowler, Ch.F. , Biophysik, 2, 16 (1964).

47. Sutton, H.C. , Biochem. J., 64, 456 (1956).

48. Okada, S. , Arch. Biochem. Biophys., 67, 113 (1957).

49. Arnaud, Y. und Coelho, R. , Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 275 (1969).

50. Giovanozzi-Sermanni, G. und Di Marco, G. , Radiat. Res., 26, 63 (1965).

51. Holladay, W., Augenstein, E. und Augenstein, L. , Radiat. Res., 28, 132 (1966).

52. Roozen, J.P. und Pilnik, W. , Lebensm.-Wiss. u. Technol., 3, 37 (1970).

53. Roozen, J.P. und Pilnik, W. , Lebensm.-Wiss. u. Technol., 4, 24 (1971).

54. Roozen, J.P. und Pilnik, W. , Lebensm.-Wiss. u. Technol., 4, 93 (1971).

55. Roozen, J.P. und Pilnik, W. , Lebensm.-Wiss. u. Technol., 4, 158 (1971).

56. Roozen, J.P. und Pilnik, W. , Lebensm.-Wiss. u. Technol., 4, 196 (1971).

57. Koe, W.J. de , Rapport no. 1568, Sprenger Instituut, Wageningen 1967.

58. Staden, O.L. , Proceedings of a symposium on food irradiation, IAEA, Wien 1966, p.609.

59. Daniels, M., Scholes, G. und Weiss, J. , Nature, 171, 1153 (1953).

60. Dixon, M. und Webb, E.C. , Enzymes, Longmans, London 1965, p. 453.

61. Delincée, H. und Radola, B.J. , Biochim. Biophys. Acta, 214, 178 (1970).

Summary.

On the stability of adsorbed enzymes in water deficient systems. VI. Possibilities for enzyme inactivation in dried foodstuffs by irradiation. A discussion based on results from literature and own research.

The literature on the influence of ionising radiation on enzyme activity is discussed and enzymes mainly active in foodstuffs are considered. An attempt is made to formulate general conclusions from own results with enzyme-polymer systems. According to these the radiation sensitivity of these systems is a function of the molecular weight of the enzymes (with exceptions), of the kind of polymer used and of the relative humidity during irradiation. The observed phenomena are, however, too complicated for a general application to foodstuffs.

Zusammenfassung

Den Einfluss ionisierender Strahlen auf die Aktivität von Enzymen ist besprochen, wobei vor allem Enzyme berücksichtigt werden, welche in Lebensmitteln vorkommen. Gleichzeitig wird versucht die Resultate eigener Versuche an Enzym-Polymer Systemen zu interpretieren und zu allgemein gültigen Schlussfolgerungen zu kommen. Danach ist die Bestrahlungsempfindlichkeit der untersuchten Systeme eine Funktion des Molekulargewichtes der Enzymkomponente, allerdings mit Ausnahmen, sowie der Art des Polymers und des r.L.-Wertes während der Bestrahlung. Die Verhältnisse liegen aber zu kompliziert um aus den Modelversuchen zu allgemein gültigen Aussagen über Lebensmittel zu kommen.