



# Der Einfluss thermischer Behandlung von Spinat im Temperaturbereich bis 100°C auf den Gehalt an wesentlichen Inhaltsstoffen

## IV. Peroxydase

R. Duden, A. Fricker, K. Heintze, K. Paulus und H. Zohm

Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Institut für Chemie und Technologie, 75, Karlsruhe (Deutschland)

(Eingegangen 10. Januar 1975, Angenommen 13. Januar 1975; lwt 310)

*Frühjahrs- und Herbstspinat, der bei 70, 80, 90 und 100°C verschieden lange erhitzt worden war, wurde auf Peroxydase-Restaktivitäten untersucht. Da Peroxydase in diesen Materialien zu über 99% in partikelgebundener Form vorliegt, wurde der Inaktivierungsverlauf des Enzyms anhand von Spinatsuspensionen ermittelt. Die Inaktivierungskurven wiesen 2 annähernd lineare Abschnitte auf, die einer ersten schnellen Inaktivierungsphase und einer stark verzögerten weiteren Enzymdestruktion entsprechen. Aus den steilen Abschnitten der Kurven wurden D-Werte ermittelt; diese wiesen für Frühjahrs- und Herbstspinat nur geringfügige Unterschiede auf. Die aus der Temperaturabhängigkeit der D-Werte ermittelten z-Werte betragen 33°C für Frühjahrsspinat und 45°C für Herbstspinat.*

**Influence of heat treatment of spinach at temperatures up to 100°C on important constituents**

### IV. Peroxidase

Spinach harvested in spring and autumn which had been heated to 70°, 80°, 90° and 100°C for varying periods of time has been tested for remaining peroxidase activity. Since in these materials peroxidase is to more than 99% bound to particles, the inactivation course of the enzyme has been studied on spinach suspensions. The inactivation curves show two almost linear sections corresponding to a first rapid inactivation phase and a second highly delayed phase of further enzyme destruction. D-values have been calculated from the steep curve sections; only minor differences were found in the D-values of spring and autumn spinach. The z-values calculated from the temperature dependence of D-values were 33°C for spring spinach and 45°C for autumn spinach.

### 1.0 Einleitung

Zur Kontrolle des Blanchierprozesses wird meist der Peroxydase-, zuweilen auch der Katalasetest benutzt, obwohl ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Peroxydase- bzw. Katalase-Restaktivitäten und Qualitätsminderungen der blanchierten Lebensmittel nicht erwiesen zu sein scheint (1). Häufig wird angenommen, dass alle schädlichen Enzyme inaktiviert sind, wenn Peroxydase bzw. Katalase nicht mehr nachgewiesen werden können, was jedoch besonders im Fall der thermolabileren Katalase keineswegs immer zutrifft.

WINTER (2a, b) hat die thermische Inaktivierung der Peroxydase von verschiedenen Gemüsearten untersucht und dabei festgestellt, dass die Zeitverlaufskurven der thermischen Inaktivierung in manchen Fällen einen ausgeprägten Knick erkennen lassen. Die von CLOCHARD und Mitarbeitern (3) dargestellten Inaktivierungskurven weisen statt eines Knicks eine scharfe Krümmung auf und sind den von WINTER für Möhren, Bohnen, Spinat, Erbsen und Kartoffeln beschriebenen Kurven sehr ähnlich.

Peroxydasefreiheit würde man in solchen Fällen nur durch intensive Hitzebehandlung erreichen. Lange Blanchierzeiten und hohe Blanchiertemperaturen sind aber mit dem Verlust wasserlöslicher bzw. dem thermischen Abbau hitzelabiler Inhaltsstoffe und einem «Aufweichen» der Gewebestrukturen verbunden. Es sollte daher nur so weit blanchiert werden, wie zur Inaktivierung derjenigen Enzyme erforderlich ist, die

tatsächlich Qualitätsverschlechterungen auszulösen vermögen. Beispiele für solche Enzyme sind Lipasen, Phospholipasen, Lipoxygenasen, aber auch Chlorophyllasen und Gerüstsubstanzen spaltende Enzyme (Pektinasen, Pektasen, Cellulasen usw.).

Es wäre danach wünschenswert, die Inaktivierung aller dieser Enzyme bei thermischen Verfahren zu untersuchen, um so bessere Kriterien für eine optimale Behandlung zu finden, als dies bei den üblichen «presence-absence»-Tests mit Peroxydase oder Katalase möglich ist. Ziel der Arbeiten sollte es sein, diejenigen Prozessbedingungen zu ermitteln, die es ermöglichen, Enzyme, die mit der Qualität der Produkte interferieren, auf eine die übrigen Inhaltsstoffe möglichst wenig schädigende Weise auszuschalten.

In der vorliegenden, sich auf Spinat beschränkenden Arbeit wird zunächst versucht, das thermische Verhalten der Peroxydase unter möglichst praxisnahen, aber gleichzeitig einen weiten Temperatur-Zeit-Bereich umfassenden Bedingungen zu studieren, da in Modellversuchen mit reinen Enzymlösungen gewonnene Inaktivierungsdaten nicht ohne weiteres auf Lebensmittel übertragen werden können. Wechselwirkungen mit anderen Inhaltsstoffen, verschiedene Thermoresistenz von Isoenzymen und auch die Bindungsverhältnisse könnten zu von Modellversuchen stark abweichenden Ergebnissen führen. In ähnlicher Weise, wie hier für Peroxydase beschrieben, sollen in späteren Untersuchungen weitere technologisch wichtige Enzyme behandelt werden, um so Enzymprofile in Abhängigkeit von Behandlungszeit und -temperatur zu erhalten.

## 2.0 Durchführung der Versuche

### 2.1 Behandlung des Versuchsgutes

Vorbehandlung, thermische Behandlung und Lagerung der Spinatproben wurden in einer vorangehenden Publikation beschrieben (4). Die bei  $-50^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Blätter wurden bei  $-25^{\circ}\text{C}$  in einer Zahnscheibenmühle zerkleinert, in einer Kaffeemühle fein gemahlen und wiederum bei  $-50^{\circ}\text{C}$  bis zur Untersuchung gelagert.

### 2.2 Bestimmung der Peroxydase

Die Peroxydase-Aktivität wurde mit o-Phenylendiamin als Wasserstoffdonator nach einer von WALLERSTEIN und Mitarb. (5) angegebenen und von WINTER (2a) modifizierten Methode bestimmt. Hierzu wurde

a) die Gesamtkonzentration in einer aus dem gemahlten Material erhaltenen Suspension und

b) die nach dem Filtrieren der Suspension in Lösung befindliche Peroxydaseaktivität in relativen Einheiten ermittelt.

Im einzelnen verfahren wir wie folgt:

a) 1 g fein zerkleinerter tiefgefrorener Spinat wurde je nach der Aktivität in 400 bis 2400 ml bidest. Wasser suspendiert. Unmittelbar darauf wurden 8 ml der so erhaltenen Suspension mit 2 ml 0,5 M-Acetatpuffer (pH 5) vermischt, 5 min bei  $25^{\circ}$  unter Rühren temperiert und mit 1 ml 0,3%iger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung versetzt. Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 1 ml 1%iger alkoholischer o-Phenylendiamin-Lösung, die Unterbrechung der Reaktion – nach jeweils 2 und 5 Minuten – durch Hinzufügen von 2 ml 35%iger Natriumdisulfidlösung. Danach wurde mit Methanol auf 20 ml aufgefüllt, im Dunkeln filtriert und die Extinktion bei 436 nm gemessen. Die durch 3 dividierte Differenz aus den 5- und 2-Minuten-Werten stellt das Mass der Enzymaktivität dar ( $\Delta E/\text{min}$ ).

b) 10 g tiefgefrorenes Spinatpulver wurden mit 90 ml bidest. Wasser verrührt und die Mischung 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand ergab nach Filtration durch ein Membranfilter (Porenweite  $0,6 \mu$ ) eine klare Lösung. 0,5 – 1 ml hiervon wurden mit Wasser auf 8 ml verdünnt, mit 2 ml 0,5 M-Acetatpuffer pH 5 versetzt und wie unter a) beschrieben weiterbehandelt, wobei das Filtrieren vor der Messung entfiel.

## 3.0 Ergebnisse

### 3.1 Eichkurve

Durch Verdünnen von Suspensionen unbehandelten Spinats mit Pufferlösung wurden zwei Konzentrationsreihen angesetzt und die Extinktionen gemessen. In beiden Fällen ergab sich ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen den Extinktionsdifferenzen und der Menge suspendierten Materials (Abb. 1).

Aufgrund der so festgestellten Linearität der Eichkurve konnten die auf eine Reaktionsminute bezogenen Extinktionsdifferenzen unmittelbar als Mass für die Peroxydaseaktivität verwendet werden, da bei unseren Untersuchungen keine absoluten Aktivitäten benötigt wurden.

### 3.2 Mengenverhältnis zwischen wasserlöslicher und gesamter Peroxydaseaktivität

Mit bidest. Wasser oder Puffer von niedriger Ionenstärke (0,007 M-Phosphatpuffer pH 7) konnten nur etwa 2 bzw. 4% der gesamten in der Suspension vorhandenen Aktivität extrahiert werden. Versuche, die adsorbierte bzw. membrangebundene Hauptmenge der Peroxydase in lösliche Form überzuführen, wurden nicht unternommen, weil befürchtet wurde, dass die Extraktion entweder nicht vollständig sein würde oder – bei «härteren» Extraktionsbedingungen – ein Aktivitätsverlust eintreten könnte. Dies hätte sich dann auf die Ergebnisse auswirken können, wenn sich durch die thermische Behandlung eine Verschiebung des Verhältnisses der verschiedenen Peroxydaseanteile zueinander ergeben hätte.

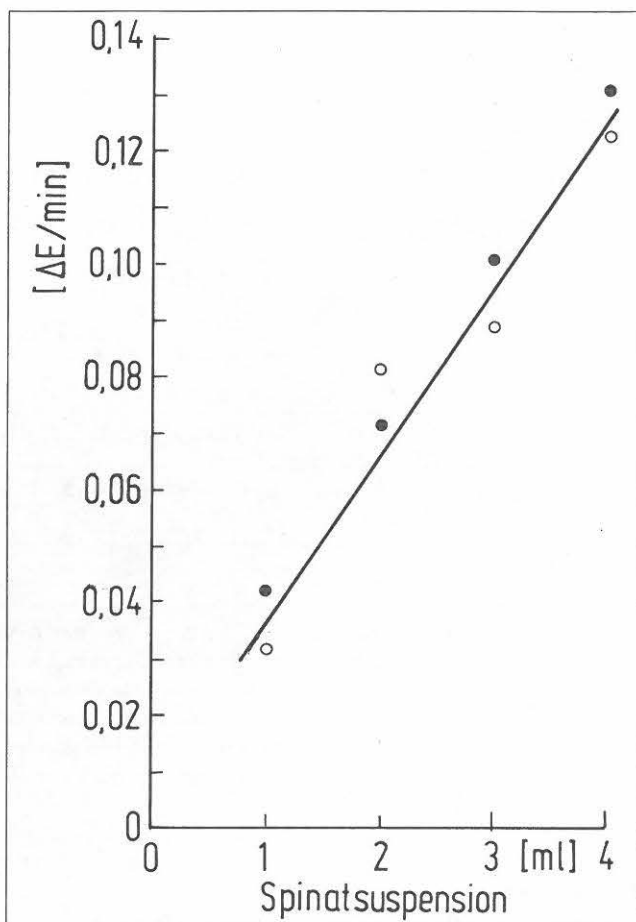
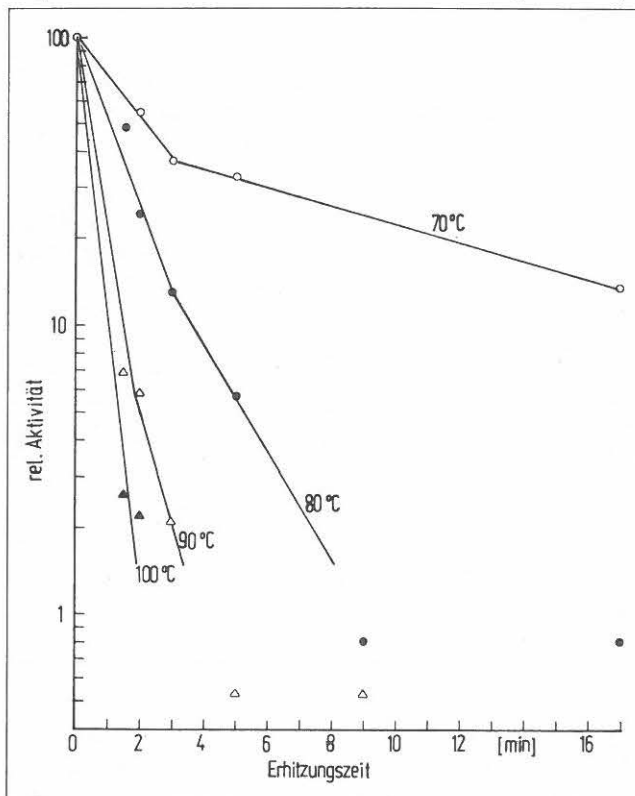


Abb. 1 Peroxydase-Eichkurve, aufgenommen mit Suspensionen thermisch nicht behandelten tiefgefrorenen Spinats (1 g/l); 2 Messreihen, durch offene bzw. volle Punkte gekennzeichnet,

Abb. 2 Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung von Frühjahrsspinat bei verschiedenen Behandlungstemperaturen

$\Delta E$ , Extinktionsdifferenz/min, behandelter Spinat

$\Delta E_0$ , Extinktionsdifferenz/min, unbehandelter Spinat





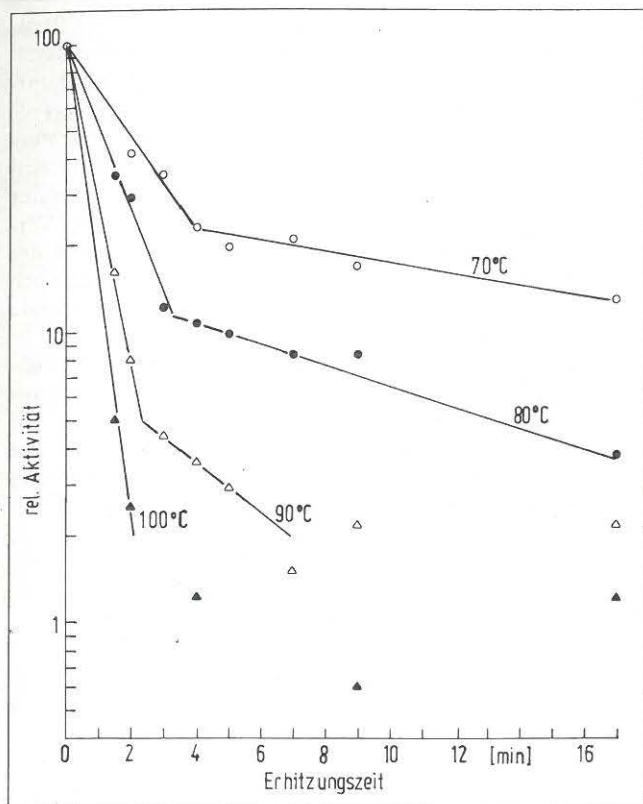


Abb. 3 Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung von Herbstspinat bei verschiedenen Behandlungstemperaturen

$\Delta E_t$ , Extinktionsdifferenz/min, behandelter Spinat  
 $\Delta E_0$ , Extinktionsdifferenz/min, unbehandelter Spinat

### 3.3 Inaktivierungsverlauf

In den folgenden Abbildungen sind – jeweils für Frühjahr- und Herbstspinat – die Inaktivierungskurven für die partikelgebundene Peroxydase dargestellt (Abb. 2, 3).

Man ersieht aus den Kurven, dass die Inaktivierung in der Anfangsphase relativ schnell verläuft, dass aber von bestimmten Restaktivitäten ab die weitere Inaktivierung sehr langsam vonstatten geht. Lediglich bei 100°C ist der zu beobachtende «Knick» nicht mehr deutlich. D-Werte, die man aus den Anfangsphasen ablesen kann, und die angeben, in welcher Zeit eine bestimmte Ausgangsaktivität bei konstanter Temperatur auf 10% herabsinkt (Tab. 1), erlauben daher auch nur eine Voraussage über die nach der Hitzeeinwirkung verbleibende Restaktivität, wenn man sich auf den ersten Kurventeil beschränkt. Das gleiche gilt für die aus Abb. 4 entnommenen z-Werte, die angeben, welche Temperaturerhöhung erforderlich ist, um die D-Werte auf ein Zehntel des Ausgangswertes herabzusetzen. Aus den geringfügigen Unterschieden der D- und z-Werte von Frühjahr- und Herbstspinat folgt, dass sich die hierin enthaltenen Peroxydasen thermisch nahezu gleich verhalten. Diese Aussage beschränkt sich allerdings auf die hier untersuchte Spinatsorte.

Tab. 1 Zusammenstellung der D- und z-Werte für Peroxydase

	D-Werte (min)				z-Werte (°C)
	70°	80°	90°	100°	
partikelgebunden, Frühjahrsspinat	7,5	3,5	1,6	1,05	33
partikelgebunden, Herbstspinat	6,2	3,5	2,0	1,3	45

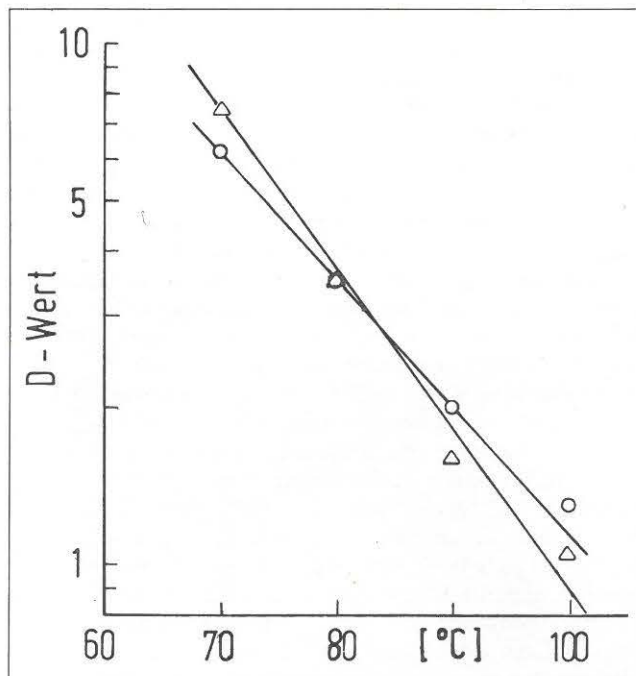


Abb. 4 Abhängigkeit der D-Werte (Destruktionswerte, Zehntelwertzeiten) von der Temperatur («thermal destruction time (TDT) curves»)

$\Delta$  Frühjahrsspinat  
 O Herbstspinat

### 4.0 Diskussion

Die aus Gründen einer möglichst weitgehenden Annäherung an die Praxis gewählten Behandlungsbedingungen (4) haben eine gewisse Unsicherheit der Messwerte zur Folge; diese wird noch durch die unvermeidbaren materialbedingten Schwankungen in der Zusammensetzung und in den geometrischen Abmessungen sowie durch die Schwierigkeiten einer genauen Dosierung der Suspensionen bei der Analyse verstärkt. Hierdurch dürften die Streuungen der in den Abbildungen dargestellten Daten zu erklären sein. Trotz der teilweise beträchtlichen Einzelabweichungen liegen die D-Werte in der halblogarithmischen Darstellung der Abb. 4 recht genau auf einer Geraden und lassen eine verhältnismässig sichere Bestimmung der z-Werte zu. Diese in Tab. 1 angegebenen Werte stimmen relativ gut mit dem von RESENDE (6) ebenfalls für Spinat ermittelten Wert ( $z = 29^\circ\text{C}$ ) überein.

Vergleicht man die D-Werte der Tab. 1 mit dem von JOFFEE und BALL (7) für Meerrettichperoxydase angegebenen Wert  $D_{85} = 143$  min, so stellt man einen Unterschied von fast 2 Zehnerpotenzen fest.

Bei diesem Vergleich ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Enzyme verschiedenen Materialien entstammen und insofern voneinander abweichende Stoffkonstanten aufweisen können. Auch die Enzymkonzentrationen können die D-Werte beeinflussen. Eine weitere Ursache für die Diskrepanz könnte in der Wirkung von Begleitstoffen auf die Spinatperoxydase liegen. Im Falle der Meerrettich-Peroxydase wurde ein solcher Effekt für Lecithin nachgewiesen (8).

Die Form der von uns ermittelten Inaktivierungskurven entspricht den in der Literatur für Peroxydase beschriebenen recht gut. YAMAMOTO (9) erklärt den beobachteten «Knick» u.a. durch das Vorhandensein von Isoenzymen verschiedener Hitzeresistenz.

DELINCEE (10 a, b) bestätigte diese Auffassung durch den experimentellen Nachweis verschieden thermostabiler Isoenzyme in Meerrettich-Peroxydase und durch den geradlinigen Verlauf der Inaktivierungskurve eines von ihm isolierten Isoenzym (pI 7,1). WINTER (2b) kommt zu dem Schluss, dass

die Ursache für das Abknicken der Inaktivierungskurven in der Umwandlung einer hitzelablen Form der Peroxydase in ein hitzestabileres Umwandlungsprodukt liegen müsse. CLOCHARD (3) stellt fest, dass prinzipiell beide Möglichkeiten den tatsächlich beobachteten Kurvenverlauf erklären können, dass jedoch die Annahme eines Übergangs von mehreren hitzelablen Isoenzymen in thermostabilere Übergangsformen den experimentellen Ergebnissen am besten entspricht. DELINCEE konnte bei Bohnen-Peroxydase (10c) die Umwandlung hitzelabiler Isoenzyme in hitzestabilere Formen nachweisen, wobei die isoelektrischen Punkte der neu entstandenen Isoenzymtypen den pI-Werten bereits im Ausgangsmaterial vorhandener Fraktionen entsprachen.

Die Feststellung WINTERS, die Peroxydase sei für die Kontrolle des Blanchierprozesses wenig geeignet, wird durch unsere Versuche für niedrige Blanchiertemperaturen bestätigt, bei denen die Inaktivierungskurven einen deutlichen Knick aufweisen. Bei Temperaturen über 90°C liegt der Knick im Bereich sehr geringer Restaktivitäten, die für die Qualitätserhaltung kaum noch eine Rolle spielen dürften; oberhalb dieser Temperatur könnte man danach ohne grösseren Fehler mit einer einfachen Reaktion erster Ordnung rechnen. Die Frage, welche Restaktivität im Einzelfall gerade noch keine Qualitätseinbusse mit sich bringt, lässt sich vorerst nicht beantworten, da, wie eingangs erwähnt, die Korrelation zwischen «Qualität» und potentieller Peroxydase-Wirksamkeit nicht erwiesen ist. Peroxydase kann ja nur dann überhaupt zur Wirkung kommen, wenn gleichzeitig Wasserstoffperoxyd als H-Acceptor zur Verfügung steht. Dieses müsste also erst durch Parallelreaktionen gebildet werden, wodurch zusätzliche Faktoren ins Spiel kommen, die keinen direkten Bezug zum Aktivitätszustand des Enzyms haben.

Von grosser Bedeutung für die Restaktivitäten aller Enzyme sind die geometrischen Abmessungen der Produkte. Darauf hat bereits WINTER (2a) hingewiesen. SVENSSON und ERIKSSON (1) stellten im Falle von Erbsen exakte Berechnungen für den Einfluss des Radius auf die Lipoxygenase-Restaktivität an. Dabei ergab sich, dass kleine Differenzen in den Abmessungen grosse Unterschiede in den Restaktivitäten bedingen können. Bei Erbsen mit einem Durchmesser von 4,3 mm wurden nach 30 sec. Blanchieren bei 90°C noch 8% der Ausgangsaktivität, bei solchen von 5 mm Durchmesser dagegen noch 45% nachgewiesen.

Wir halten es daher für möglich, dass beim Spinat die Blattstiele unter bestimmten Bedingungen die gesamte Restaktivität oder den grössten Teil davon enthalten, da die Temperaturdurchdringung bei diesen eine weit längere Zeit erfordert als bei den wesentlich dünneren Blattspalten. Die zur Erreichung einer bestimmten Restaktivität erforderliche Temperatureinwirkung dürfte u.U. stark zu verringern sein, wenn man nur die Blattspalten verwenden könnte. Zur Ermittlung der Verteilung der Peroxydase auf Blattspalten und -stiele und der in beiden Blatteilen nach der thermischen Behandlung noch verbleibenden Restaktivitäten sind jedoch noch eingehende Versuche erforderlich.

Aufgrund der geringen Unterschiede der z-Werte bei Frühjahrs- und Herbstspinat lässt sich schliessen, dass die Anbaubedingungen die Thermoresistenz der Peroxydase nur wenig beeinflussen und es daher nicht erforderlich ist, die Blanchierbedingungen den Anbaubedingungen entsprechend zu modifizieren. Dies gilt allerdings zunächst nur für die hier untersuchte Spinatsorte.

#### Literaturverzeichnis

- 1 SVENSSON, S.G., ERIKSSON, C.E., *Lebensm.-Wiss. und -Technol.*, 7, 145 (1974)
- 2a WINTER, E., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 141, 201 (1969)
- 2b WINTER, E., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 145, 3 (1971)
- 3 CLOCHARD, A., GUERN, J., *Revue Générale du Froid*, 8, 860 (1973)
- 4 PAULUS, K., FRICKER, A., DUDEN, R., HEINTZE, K., ZOHN, H., *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, 8, 7 (1975)
- 5 WALLERSTEIN, J. u. Mitarb., *Biochim. biophys. Acta*, 1, 327 (1947)
- 6 RESENDE, R., FRANCIS, F.J., STUMBO, C.R., *Food Technol.*, 23, 66 (1969)
- 7 JOFFEE, F.M., BALL, C.O., *J. Food Sci.*, 27, 587 (1962)
- 8 PARK, K.H., unveröffentlicht
- 9 YAMAMOTO, H.Y., STEINBERG, M.P., NELSON, A.I., *J. Food Sci.*, 27, 113 (1962)
- 10a DELINCEE, H., Diss. TU München, 1972.
- 10b DELINCEE, H., RADOLA, B.J., DRAWERT, F., *Acta Alimentaria*, 2, 259 (1973)
- 10c DELINCEE, H., IV. Intern. Congr. Food Science and Technol., Madrid 1974, im Druck.