

Lebensmittel	Gehalt an Vitamin B ₁ in mg			
	Souci-Fachmann-Kraut	Droese-Bramsel	DGE	Eigene Werte
Möhren	0,067 (0,050—0,080)	0,080	0,050	0,050
Kopfsalat	0,057 (0,040—0,080)	0,060	0,050	0,080
Spinat	0,086 (0,050—0,140)	0,080	0,050	0,175
Tomaten	0,057 (0,016—0,080)	0,060	0,050	0,040
Kohlrabi	0,053 (0,022—0,070)	0,080	0,050	0,065
Chicorée	0,051 (0,040—0,085)	0,080	0,050	0,130 (0,090—0,160)
Sauerkraut	0,027 (0,020—0,030)	0,020	0,050	0,070
Paprikaschoten	0,060 (0,040—0,090)		0,050	0,050
Rosenkohl	0,110 (0,080—0,150)	0,190	0,100	0,160
Rhabarber	0,027 (0,010—0,050)	0	0,020	0,060
Gurken	0,018 (0,005—0,030)	0,040	0,010	0,010
Blumenkohl	0,110 (0,050—0,150)	0,110	0,050	0,110 (0,050—0,240)
Zwiebeln	0,033 (0,030—0,040)	0,020	0,030	0,070 (0,045—0,095)
grüne Bohnen	0,073 (0,060—0,140)	0,150	0,050	0,105
frische Erbsen	0,280 (0,150—0,500)	0,200	0,100	0,210
Kartoffeln	0,110 (0,054—0,180)	0,090	0,100	0,120
Orangensaft, frisch ausgepreßt	0,090 (0,080—0,100)	0,110	0,100	0,140

Literatur

1. Droese, W., Bramsel, H.: Vitamintabellen. Beihefte zur Zeitschrift „Die Ernährung“, 2. erweiterte Auflage. Leipzig: J. Ambrosius Verlag 1943.
2. Souci, Fachmann, Kraut: Die Zusammenstellung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen. Stuttgart: Wiss. Verlagsgesellsch. mbH 1962.
3. Wirths, W.: Kleine Nährwerttabelle der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V., 18. Aufl. Frankfurt a. M.: Umschau-Verlag 1969.
4. Wildemann, L.: Nahrung 4, 497—511 (1960).
5. Wildemann, L.: Ernährungswiss. 5, 123—134 (1964).

Dr. Liesel Wildemann
Forschungsinstitut für Kinderernährung
D-4600 Dortmund-Brünninghausen,
Jägerndorfstr. 11

Hitzebeständigkeit der Peroxydase

E. WINTER

Mitteilung aus dem Institut für Chemie und Technologie der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung, Karlsruhe (BRD)

Eingegangen am 2. Juli 1970

Heat Resistance of Peroxydase

Summary. The heat resistant peroxydase, which appears besides a heat labile peroxydase in many vegetable varieties, is also detectable in pure peroxydase. Kinetical and electrophoretical measurements proved, that the peroxydatic activity, which endured longer heating, could be related neither to the presence of a heat resisting cytochrome nor to the presence of more or less heat resisting isomers of the peroxydase. It rather seems to be a compound of the heat-denaturated protein of the enzyme with enzymatic groups of the peroxydase, which were formed during heating, and which remained effective.

Zusammenfassung. Die in vielen Gemüsearten beim Erhitzen neben einer wärmeempfindlichen Peroxydase auftretende hitzebeständige Peroxydase ist auch in Reinerperoxydase nachweisbar. Durch reaktionskinetische sowie elektrophoretische Messungen wurde bewiesen, daß

die nach längerem Erhitzen noch vorhandene peroxydatische Wirksamkeit weder auf die Anwesenheit des hitzebeständigen Cytochroms noch auf das Vorhandensein mehr oder weniger hitzebeständiger Isomeren der Peroxydase zurückgeführt werden kann. Es dürfte sich vielmehr um eine beim Erhitzen sich bildende wärmebeständige Verbindung des hitzedenaturierten Enzyrneiweißes mit noch wirksam gebliebenen Enzymgruppen der Peroxydase handeln.

Einleitung

Bei einigen Gemüsearten kann die vorhandene Peroxydase nur durch sehr langes Erhitzen auf 100° C vollständig zerstört werden, wie insbesondere Zoueli u. Esselen [5] festgestellt haben. Es wird vielfach angenommen, daß die länger bestehende peroxydatische Wirksamkeit durch die Anwesenheit von Cytochrom bedingt ist, nachdem Keilin [1] gezeigt hatte, daß alle Pflanzen hitzebeständiges Cytochrom enthalten. Neuerdings wurde von Yamamoto, Steinberg u. Nelson [4] das Vorkommen verschieden hitzebeständiger Isomeren der Peroxydase als Ursache vermutet, während Winter [3] zur Erklärung die Bildung peroxydatisch wirksam bleibender Zersetzungsprodukte des Enzyms beim Erhitzen annahm. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit Hilfe von reaktionskinetischen und elektrophoretischen Verfahren eine Entscheidung zwischen diesen drei Möglichkeiten zu treffen.

Versuchsdurchführung

Zur Untersuchung gelangten Meerrettich, Reinperoxydase und Cytochrom. Der Meerrettich wurde in Form von Scheiben, als Brei mit einer Konzentration von 100 g/l, sowie als klares Filtrat des Breies angewandt. Als Reinperoxydase wurde Peroxydase „EPAA“ aus Meerrettich für analytische Zwecke von C. Boehringer, Mannheim verwendet. Von derselben Firma stammte das benutzte kristallisierte Cytochrom c „ECAG“ aus Pferdeherz. Die angewandten Enzymkonzentrationen betragen bei den Versuchen zum Zerfallsverlauf 0,1 mg je ml 0,05-m-Phosphatpuffer pH 6,8. Das Erhitzen auf 100° C geschah wie bei Winter [3]. Die peroxydatische Wirksamkeit wurde mit o-Phenylendiamin gemessen; eine Bestimmung mit Guajakol führte zu ähnlichen Kurven. Die Peroxydasewirksamkeit wurde in U/g und U/mg Frischgut bzw. Reinz enzym angegeben, wobei U internationale Enzymeinheiten in μmol Substratumsatz (H_2O_2) je min bedeuten.

Zur Papierelektrophorese (4 V/cm, 0,05-m-Phosphatpuffer pH 6,8) wurde die Probe auf die Streifenmitte aufgetragen. Die Banden wurden durch Besprühen mit Guajakol bzw. Guajakharz und Wasserstoffperoxyd sowie durch Anfärben mit Amidoschwarz 10 B sichtbar gemacht. Zur Prüfung der aufgetragenen Proben auf Hitzebeständigkeit wurden die feuchten Streifen im geschlossenen Glasrohr erhitzt.

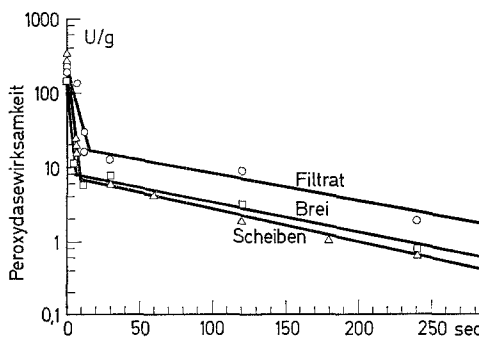


Abb. 1

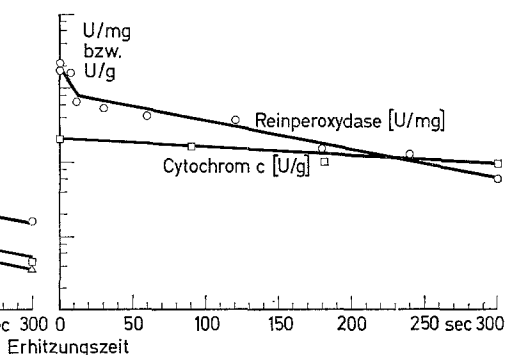


Abb. 2

Abb. 1. Abnahme der peroxydatischen Wirksamkeit von Meerrettich beim Erhitzen auf 100° C. Brei und Filtrat in Glaskugeln erhitzt

Abb. 2. Abnahme der peroxydatischen Wirksamkeit von Reinperoxydase und Cytochrom c beim Erhitzen auf 100° C in Glaskugeln

Ergebnisse

Beim Erhitzen nimmt die Peroxydasewirksamkeit von Meerrettich nach Abb. 1 ab. Der Zerfall der Peroxydase verläuft in einer Reaktion I. Ordnung; den steilen Kurventeilen *a* bzw. den flachen Kurventeilen *b* entsprechen wie bei Winter [3] verschiedene Zerfallsgeschwindigkeiten, denen die Zehntelwertszeiten *D* umgekehrt proportional sind. Diese sind in Tab. 1 aufgeführt, in der außerdem die am Knickpunkt der Kurventeile noch vorhandene peroxydatische Wirksamkeit *B* in Prozent der ursprünglichen angegeben ist. Bei Reinperoxydase zeigte sich nach Abb. 2 beim Erhitzen ein ähnlicher Kurvenverlauf, für Cytochrom ergab sich dagegen eine einfache Gerade mit nur schwacher Neigung. Cytochrom war fast 10⁴mal weniger peroxydatisch wirksam als Reinperoxydase.

Tabelle 1. *Abnahme der peroxydatischen Wirksamkeit von Meerrettich, Reinperoxydase und Cytochrom beim Erhitzen auf 100° C. Abkürzung: PO = Peroxydase-Wirkung, D = Zehntelwertszeit, a bzw. b = Kurventeil, B = Wirksamer Anteil*

Probe	PO in U/g	D in sec für		B in %
		a	b	
Meerrettich:				
Scheiben	300	5	230	2,3
Brei	150	6	250	5,2
Filtrat	220	14	280	7,4
Peroxydaselösung	190 000	31	270	39,0
Cytochromlösung	20	900	—	—

Bei der Elektrophorese waren die Wanderwege in Barbiturat-Acetat-Puffer pH 8,6 um etwa 20 % länger als in Phosphatpuffer pH 6,8; bei Cytochrom wurde jedoch im ersten Puffer eine störende Schweifbildung bis zur Auftragsstelle beobachtet. Alle nicht erhitzten Proben lieferten nur eine einzige einfache Bande. Es wurden keine Versuche zur Auftrennung von Isoenzymen unter Verwendung besser geeigneter Träger gemacht, da aus den weiteren elektrophoretischen Versuchen hervorging, daß Isoenzyme an dem Zustandekommen der Kurven nicht beteiligt sein konnten. Wie Tab. 2 zeigt, verschwand beim Erhitzen der Elektrophoresestreifen auf 100° C die Peroxydasebande in 23 mm Abstand von der Auftragsstelle vollständig, während eine neue Bande unmittelbar auf der Auftragsstelle erschien. In dieser war dieselbe Menge an Eiweiß anwesend, wie in der verschwundenen, während die peroxydatische Wirksamkeit stark abgenommen hatte. Nach kürzerem Erhitzen konnten zwei entsprechend schwächere Banden gleichzeitig beobachtet werden.

Auswertung

Aus den Versuchen geht hervor, daß die nach längerem Erhitzen von Gemüse noch nachweisbare peroxydatische Wirksamkeit aus folgenden Gründen nicht auf die Anwesenheit von Cytochrom zurückgeführt werden kann: 1. Die Zehntelwertszeit *D* lag bei Cytochrom entsprechend Tab. 1 bei 900 sec, während sie für den Kurventeil *b* bei Peroxydase, Meerrettich und den von Winter [3] untersuchten weiteren Gemüsearten stets 250 ± 50 sec betrug. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß pflanzliches Cytochrom andere *D*-Werte liefern könnte als tierisches Cytochrom. 2. In Reinperoxydase, deren Wirksamkeit nach Kurventeil *b* der Abb. 2 ähnlich wie für Meerrettich (Abb. 1) beim Erwärmen nur langsam abnahm, war bei den elektrophoretischen Versuchen kein Cytochrom nachweisbar, obwohl dieses bei den großen Unterschieden in den Wanderungsgeschwindigkeiten gut hätte erkennbar

sein müssen. 3. Bei der schwachen peroxydatischen Wirksamkeit von Cytochrom müßte der bekannte Eiweißgehalt der Reinperoxydase um ein Vielfaches größer sein, um den Kurventeil *b* der Peroxydase in Abb. 2 durch die Anwesenheit von Cytochrom zu erklären.

In Reinperoxydase aus Meerrettich wurden von Klapper u. Hackett [2] sowie anderen Untersuchern elektrophoretisch und chromatographisch mehrere Isoenzyme nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Elektrophorese nur eine einfache Bande bei 23 mm beobachtet werden, weshalb die Isoperoxydasen zusammen in dieser Bande vorhanden gewesen sein müssen. Wäre das Auftreten der Kurventeile *a* und *b* der Abb. 2 für Reinperoxydase auf die Anwesenheit mehr oder weniger hitzebeständiger Isomeren der Peroxydase zurückzuführen, so hätte nach dem Erhitzen noch eine entsprechend schwächere peroxydatische Wirksamkeit bei 23 mm nachweisbar sein müssen, um so mehr, als der Anteil der beim Erhitzen erhalten gebliebenen Peroxydasewirksamkeit nach Tab. 1 bei Reinperoxydase sehr hoch war. Das Auftreten des zweiten Kurventeils *b* muß daher auf die Neubildung eines peroxydatisch wirkenden Stoffes beim Erhitzen zurückgeführt werden, der bei der Elektrophorese nicht mehr wandert und dessen Wirksamkeit bei weiterem Erhitzen sehr viel langsamer abnimmt, als die des ursprünglichen Enzyms.

Die Frage nach der Beschaffenheit des neugebildeten hitzebeständigen peroxydatisch wirksamen Umwandlungsproduktes bleibt offen. Es ist möglich, daß das Protohäm in als prosthetische Gruppe der zerfallenden Peroxydase mit dem gleichzeitig denaturierten Enzymeiweiß eine neue, hitzebeständige Peroxydase bildet, es könnte aber auch sein, daß das denaturierte Enzymeiweiß noch unveränderte Peroxydase so festhält oder einschließt, daß sie gegen weiteren Zerfall durch Wärme besser geschützt ist. Bei einem Vergleich der %-Anteile *B* in Tab. 1 ergibt sich, daß diese Anteile um so höher werden, je reiner die Proben sind. Dies spricht dafür, daß die eben erwähnten Reaktions-, Adsorptions- oder Einschlußmöglichkeiten beim Erhitzen um so größer werden, je weniger Nebenbestandteile diese Umwandlungen stören. Aus der mit zunehmender Reinheit der Peroxydase abnehmenden Steilheit der Kurve *a*, entsprechend den steigenden *D*-Werten in Tab. 1, kann auf eine erhöhte Beständigkeit der ursprünglichen Peroxydase bei größerer Reinheit geschlossen werden.

Tabelle 2. Elektrophorese von Reinperoxydase und Cytochrom. Wanderweg der Banden sowie abgeschätzte Eiweißmenge und Enzymwirksamkeit. Laufrichtung stets zur Kathode

Enzym	sec 100° C	Weg mm	Färbung mit Amidoschwarz	Peroxydat. Wirkung
Peroxydase	0	23	stark	stark
Peroxydase	10	0 ; 23	mäßig ; mäßig	schwach ; mäßig
Peroxydase	60	0	stark	schwach
Cytochrom	0	52	stark	—

Literatur

1. Keilin, D.: Proc. Roy. Soc. **B 104**, 206 (1929).
2. Klapper, M., Hackett, D.: Biochim. Biophys. Acta **96**, 272 (1965).
3. Winter, E.: Diese Z. **141**, 201 (1969).
4. Yamamoto, H., Steinberg, M., Nelson, A.: J. Food Sci. **27**, 113 (1962).
5. Zoueil, M., Esselen, W.: Food Res. **24**, 119 (1959).

Dr. E. Winter, Bundesanstalt
für Lebensmittelfrischhaltung,
Inst. für Chemie und Technologie
D-7500 Karlsruhe, Engesserstr. 20