

# Bestimmung des Dipeptids $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin aus Transglutaminase-vernetzten Proteinen mittels Aminosäurenanalyse

Von A. Mautner, H. Meisel, P. Chr. Lorenzen und E. Schlimme

Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Milchforschung, Postfach 60 69, 24121 Kiel

## 1. Einleitung

Transglutaminase (EC 2. 3. 2. 13) katalysiert einen Acylgruppentransfer zwischen der  $\gamma$ -Carboxamidgruppe peptidgebundener Glutamylreste (Acylgruppendonator) und primären Aminogruppen verschiedener Aminokomponenten (Acylgruppenakzeptor). Ist die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines proteingebundenen Lysylrestes der Acylgruppenakzeptor, entstehen intra- und intermolekulare Isopeptidbindungen ( $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys). Falls keine primäre Aminogruppe im Reaktionssystem vorhanden ist, ist Wasser der Acylgruppenakzeptor. Die  $\gamma$ -Carboxamidgruppen der Glutamylreste werden dann unter Freisetzung von Ammoniak hydrolysiert (1, 2).

Durch die enzymatische Quervernetzung von Proteinen können Eigenschaften wie Textur, Löslichkeit, Schaumbildung oder auch emulgierende Eigenschaften des Eiweißes verändert werden (3). In der Lebensmittelindustrie ist der Einsatz von Transglutaminase in der Herstellung von Fleisch-, Fisch-, Getreide-, Milch- und Sojaerzeugnissen denkbar und teilweise bereits realisiert (4-12).

Im Rahmen eines laufenden Projektes (AiF-Vorhaben-Nr. 11247 N) wird der Einsatz von Transglutaminase unter anderem in der Herstellung von Joghurt untersucht. Über Ergebnisse wurde bereits berichtet (13).

Die Bestimmung der Produkteigenschaften Säuregrad, Gelfestigkeit und Molkenlössigkeit bei Joghurtherzeugnissen zeigt zwar deutliche Unterschiede der Produkte in Abhängigkeit von einer Transglutaminasebehandlung, allerdings geben die Befunde keinen direkten Hinweis auf das Ausmaß der Quervernetzung. Der direkte Nachweis ist durch Bestimmung des Dipeptids  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin aus mit Transglutaminase hergestellten Proben, bei der Proteine und Peptide zunächst mit Hilfe von proteolytischen Enzymen abgebaut werden, grundsätzlich möglich. Dabei werden die Enzyme so gewählt, daß  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin nicht in Glutamin und Lysin gespalten wird.

Zum Nachweis von  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin aus Lebensmittelproben sind in der Literatur Methoden beschrieben worden, bei denen das Dipeptid nach enzymatischer Hydrolyse mittels HPLC von den in der eingesetzten Probe enthaltenen Aminosäuren getrennt und bestimmt wird (OPA-Vorsäulenderivatisierung) (14-17). Grundlage der Bestimmungsmethoden ist das 1982 von Griffin und Mitarbeitern (17) beschriebene Verfahren. Diese Autoren beschreiben als Alternative eine weitere Bestimmung von  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin durch Aminosäurenanalyse mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung.  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin wird mit diesem Verfahren von den Aminosäuren getrennt und erscheint im Chromato-

gramm unter den beschriebenen Bedingungen zwischen Leucin und Tyrosin. 1976 wurde ein Verfahren unter Anwendung der Aminosäurenanalyse beschrieben, um  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin nach enzymatischer Hydrolyse in erhitztem Milcheiweiß nachzuweisen (18).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Probenmaterial

Als Probenmaterial wurden zunächst Natriumcaseinat und mit Transglutaminase vernetztes Natriumcaseinat (E/S 1/2000,  $T=37^{\circ}\text{C}$ ,  $t=300\text{min}$ , Inaktivierung der Transglutaminase durch Erhitzung auf  $90^{\circ}\text{C}$  für 30min) eingesetzt. Die Caseinatherstellung wurde bereits beschrieben (19).

Zur Herstellung von Milch-, Quark- und Joghurtproben wurde Sammelmilch von der Versuchsstation Schaedtbeek der Bundesanstalt für Milchforschung verwendet.

Nicht vorerhitzte Magermilch und zwei weitere Magermilchproben, die für wenige Sekunden bei  $72^{\circ}\text{C}$  bzw. für 5 min bei  $92^{\circ}\text{C}$  erhitzt wurden, wurden mit Transglutaminase inkubiert (E/S 1/2000,  $T=40^{\circ}\text{C}$ ,  $t=120\text{min}$ , Inaktivierung der Transglutaminase durch Erhitzung auf  $80^{\circ}\text{C}$  für 1min) und zum Nachweis von  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin eingesetzt.

Aus den unterschiedlich wärmebehandelten Milchproben wurde Magerquark hergestellt (2 % Säurewecker Probat M4, Wisby, Niebüll; 0,04 % Lab Naturen Standard Plus, Christian Hansen, Lübeck), der ebenfalls auf seinen Gehalt an  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin untersucht wurde.

Magermilchjoghurt wurde wie bereits beschrieben (13) aus Transglutaminase-behandelter Milch mit den Enzym-Substrat-Verhältnissen 1:2000, 1:5000 und 1:10000 hergestellt und der  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalt bestimmt.

### 2.2 Standardmaterial

Als Referenzmaterial wurde H- $\gamma$ -Glu- $\epsilon$ -Lys-OH der Firma Bachem Biochemica GmbH (Heidelberg) verwendet. Zur Kalibrierung des Aminosäureanalytators wurde der "Protein Hydrolysate Calibration Standard" von Pharmacia LKB Biochrom Ltd. (Cambridge, UK) eingesetzt. Der Standard enthält 17 Aminosäuren und Ammoniak als Ammoniumsulfat in 0,1 mol/l HCl.

### 2.3 Enzyme

Für den enzymatischen Proteinabbau wurden die folgenden Enzyme eingesetzt: Pronase (typische Zusammensetzung: neutrale Protease, Chymotrypsin, Trypsin, Carboxypeptidase, Aminopeptidase, neutrale und alkalische Phosphatase) aus *Streptomyces griseus*, Kat. Nr. 165921, Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim); Leucinaminopeptidase (EC 3. 4. 11. 1) cytosolische, aus Schweineleber, Kat. Nr. L-1503, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim); Prolidase (EC 3. 4. 13. 9) aus Schweineleber, Kat. Nr. P-6675, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim); Carboxypeptidase A (EC 3. 4. 17. 1) aus Rinderpankreas, Kat. Nr. 103225, Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim).

### 2.4 Enzymatischer Proteinabbau

Eine Probenmenge, die 20 mg Protein enthält, wurde – mit Thymol konserviert – in 3,0 ml 0,1 mol/l Boratpuffer (pH 8,0) gelöst und in einem Wasserbad auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt. Zu der Probe wurde zweimal nacheinander für jeweils 24 h Pronase in einer Menge von

0,4 U/mg Protein gegeben. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Pronase wurde durch Erhitzung des Ansatzes für 10min auf 100°C inaktiviert. Nach Abkühlen auf 37°C erfolgte der weitere Proteinabbau durch Zugabe von Leucinaminopeptidase (0,4 U/mg Protein) und Prolidase (0,45 U/mg Protein) für 24 h. Die Zugabe von Leucinaminopeptidase wurde über die gleiche Zeit wiederholt. Als letztes Enzym wurde Carboxypeptidase A in einer Menge von 0,2 U/mg Protein zugegeben. Die Inkubation erfolgte für weitere 24h bei 37°C. Nach Hitzeinaktivierung der Enzyme (100°C, 10 min) wurde die proteolytisch abgebaute Probe lyophilisiert (14).

## 2.5 Aminosäurenanalyse

Die nach enzymatischer Hydrolyse erhaltenen Lyophilisate wurden nach geeigneter Verdünnung in Probenverdünnungspuffer (pH 2,2, Molarität (Na<sup>+</sup>) 0,2 mol/l) direkt zur Aminosäurenanalyse mit dem Aminosäurenanalysator Alpha Plus (Pharmacia, Freiburg), Trennsäule mit Ionenaustauscherharz 80-203845 und Natriumcitratpuffersystem, eingesetzt. Außerdem wurden die Proben nach saurer Hydrolyse (6 mol/l HCl mit 1 % Phenol; 110°C, 24 h) analysiert. Zur Aminosäurenanalyse wurde ein Aufgabevolumen von 40 µl eingesetzt; die Detektion erfolgte bei 570 nm bzw. bei 440 nm für Prolin.

## 2.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Durchführung erfolgte unter Verwendung von Porengradientengelen (Trenngel T = 8-18 %, C = 3 %) (Pharmacia Biotech AB, Uppsala) entsprechend der Vorschrift C 30. 6. 4 im VDLUFA Methodenbuch VI (20).

## 3. Ergebnisse und Diskussion

Bei Aufstockung des Aminosäurenstandards mit synthetischem  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin erscheint  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin unter den gewählten Bedingungen im Chromatogramm zwischen Methionin und Isoleucin mit einer Retentionszeit von 26,7 min (Abb. 1).

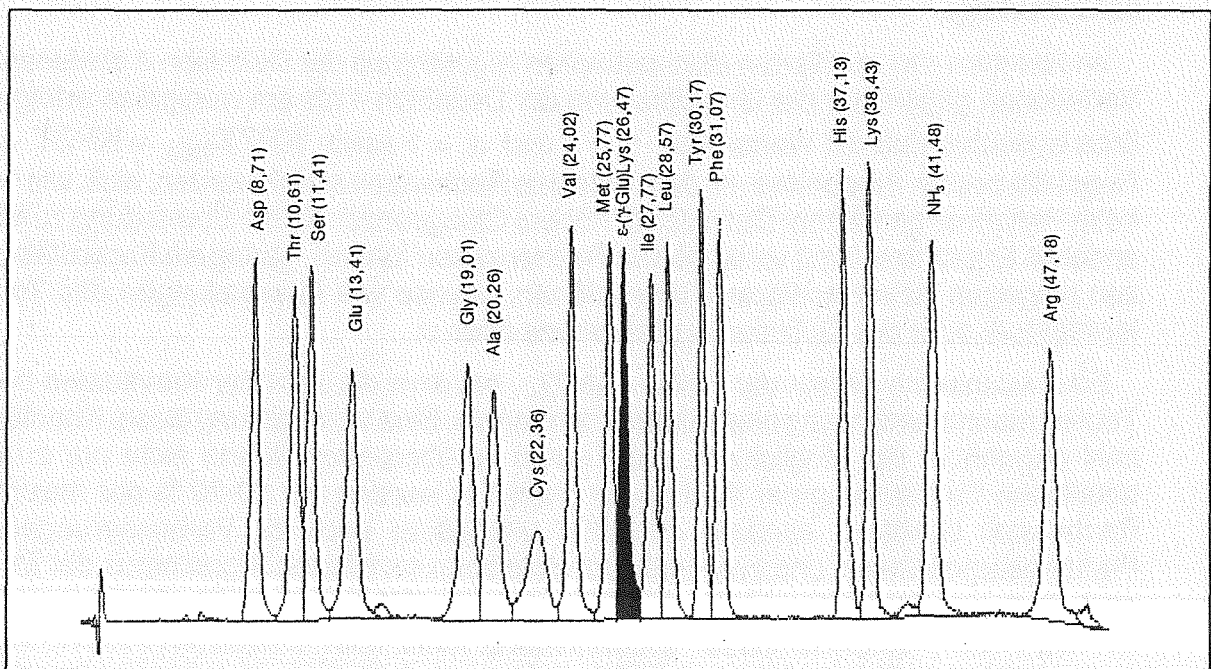


Abb. 1: Computer-bearbeitetes Originalchromatogramm eines mit synthetischem  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin (5 nmol/40 µl Aufgabevolumen) aufgestockten Aminosäurenstandards. Die Zahlen in Klammern geben die Retentionszeiten (min) an.

Der Vergleich der Aminosäuregehalte der Proben vor und nach saurer Hydrolyse läßt darauf schließen, daß durch die enzymatische Hydrolyse etwa 80-85 % des Proteins erfaßt werden. Nach enzymatischer Hydrolyse noch vorhandene Peptide werden durch saure Hydrolyse zu Aminosäuren gespalten. Der Anteil an nachgewiesenem  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin ist somit um etwa 15-20 % zu gering.

Natriumcaseinat wurde vor enzymatischer Hydrolyse mit drei verschiedenen Konzentrationen (25  $\mu$ mol, 50  $\mu$ mol, 75  $\mu$ mol) an synthetischem  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin aufgestockt. Das Verhältnis der zugegebenen Mengen  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin wurde mit Hilfe der Aminosäurenanalyse bestätigt.

Die Aminosäurenanalyse ergab einen linearen Meßbereich von 1-20 nmol synthetischem  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin im Aufgabevolumen (40  $\mu$ l). Mit 4,8-16,7 nmol  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin im Aufgabevolumen (40  $\mu$ l) aufgestockte, enzymatisch hydrolysierte Natriumcaseinatproben wurden auf ihre  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalte hin untersucht. Der lineare Zusammenhang zwischen dem  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalt (x) und der gemessenen Peakfläche (y) ist in Abbildung 2 dargestellt. Es ergab sich für  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin  $y = 216283x + 452160$ ;  $r = 0,9956$  und für mit  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin aufgestocktes Natriumcaseinat  $y = 210710x + 490728$ ;  $r = 0,9968$ . Die im Natriumcaseinat vorhandenen Aminosäuren störten den Nachweis des  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin nicht.

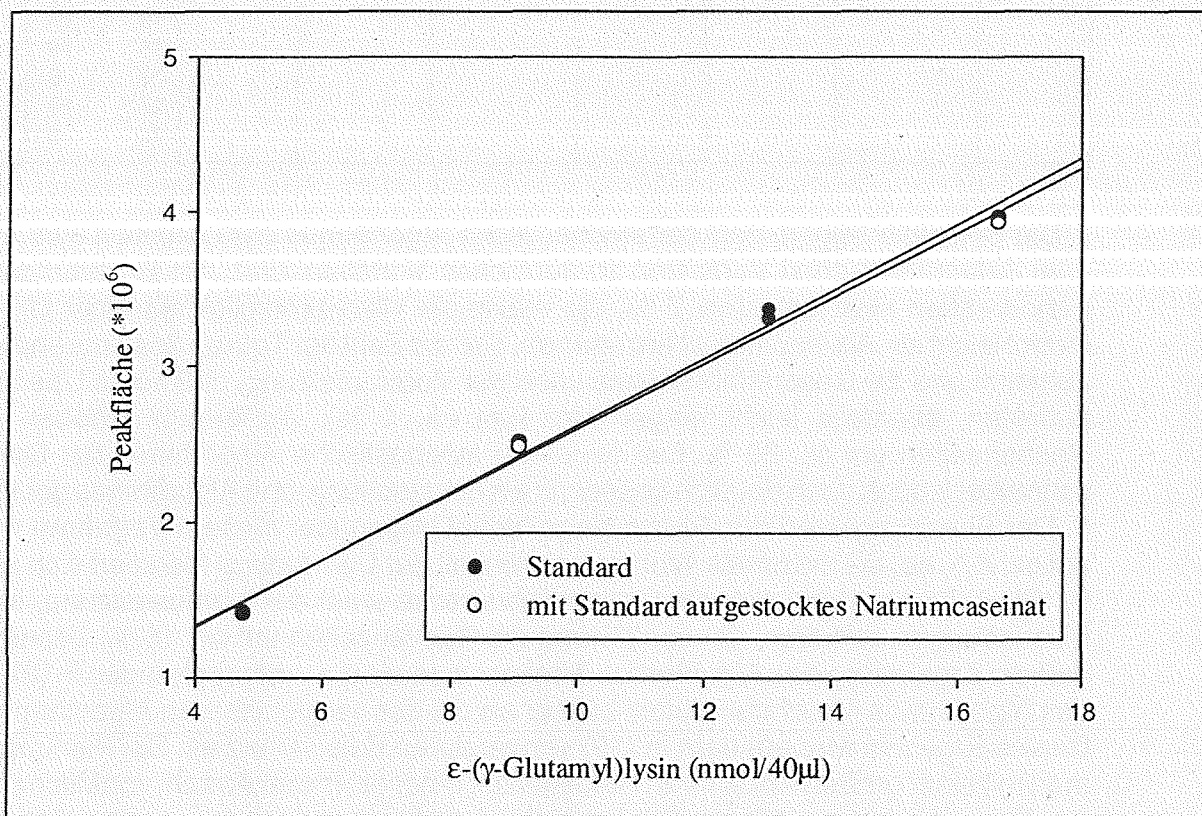


Abb. 2: Linearer Zusammenhang zwischen der Peakfläche und dem  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalt (nmol/40 $\mu$ l Aufgabevolumen) von  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin-Standard und von mit  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin aufgestocktem Natriumcaseinat

Anhand der unterschiedlichen Lysingehalte von enzymatisch abgebautem Caseinat und enzymatisch abgebautem Transglutaminase-behandelten Caseinat kann der Anteil des an der Ausbildung von Isopeptidbindungen beteiligten Lysin berechnet werden. Wenn Caseinat im Mittel 13 mol Lysin/mol Caseinat enthält (21), liegen 0,21 mol Lysin vernetzt vor (1,6 %). Da Lysin zu den essentiellen Aminosäuren zählt, wäre eine

Einbindung in die Isopeptidbindungen nicht wünschenswert, sofern  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin nicht verdaulich wäre. Untersuchungen von Yasumoto und Suzuki (22) zufolge kann  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin aber durch eine in der Niere lokalisierte  $\gamma$ -Glutamylamin-Cyclotransferase in Lysin und 5-Oxoprolin gespalten werden, das wiederum durch 5-Oxoprolinase zu Glutaminsäure abgebaut wird. Darüber hinaus wird ein weiteres Enzym,  $N^{\epsilon}$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysinhydrolase, beschrieben, das in Mikroorganismen vorkommt und  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin direkt in Lysin und Glutaminsäure spaltet. Seguro et al. (23) beschreiben die Spaltung von  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin durch in der Darmschleimhaut lokalisierte  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase in Lysin und Glutaminsäure.

Die  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalte der wie unter 2. 1 angegeben hergestellten Proben sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Umrechnung der Ergebnisse von nmol/mg Lyophilisat in  $\mu$ mol/g Protein erfolgte unter der Annahme, daß die eingesetzte Proteinmenge sich im Lyophilisat quantitativ wiederfindet. Das Chromatogramm von Magermilchjoghurt, der aus mit Transglutaminase-behandelter Milch mit dem Enzym-Substrat-Verhältnis 1:2000 hergestellt wurde, ist in Abbildung 3 dargestellt.

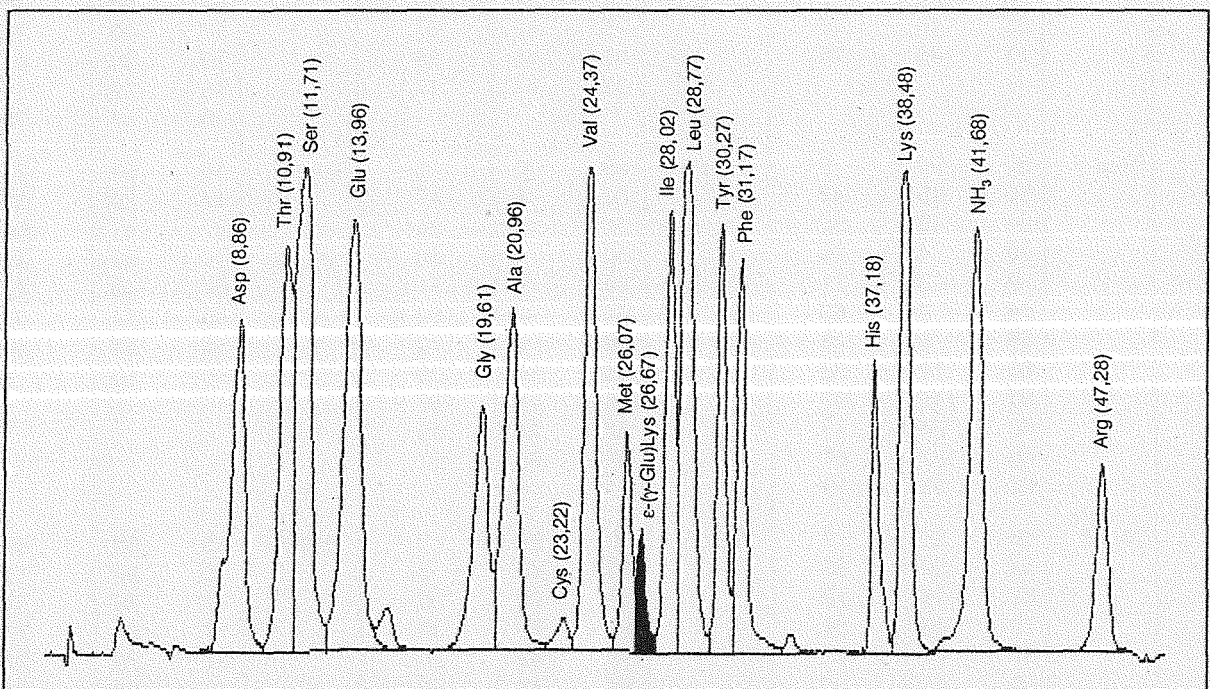


Abb. 3: Computer-bearbeitetes Originalchromatogramm einer mit Transglutaminase hergestellten Joghurtprobe. Die Zahlen in Klammern geben die Retentionszeiten (min) an.

Die Reaktivität von Transglutaminase ist in Natriumcaseinat aufgrund der Proteinstruktur und des Lysingehaltes besonders hoch (19, 24). Natriumcaseinat hatte unter den gemessenen Proben mit 13,8 nmol/mg Lyophilisat den höchsten Gehalt an  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin. In der Literatur ist das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Milchproteinfraktionen bei der Quervernetzung mit Transglutaminase beschrieben worden (25-30).

Bei den untersuchten Milchproben enthielt die am stärksten erhitzte Probe den höchsten  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalt, wohingegen  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin in mit Transglutaminase behandelter nicht-erhitzter Magermilch unter den gewählten Bedingungen mittels Aminosäurenanalyse nicht nachweisbar war.

Die  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalte der Quarkproben, die aus unterschiedlich vorerhitzter Milch hergestellt wurden, nahmen mit steigendem Wärmeeintrag zu.

Tab. 1:  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalte verschiedener Proben

Probe	$\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin (nmol/mg Lyophilisat)	$\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin ( $\mu$ mol/g Protein)
mit TG behandeltes Natriumcaseinat	13,8	73,7
nicht erhitzte Magermilch mit TG behandelt	-	-
Magermilch für wenige Sekunden bei 72°C erhitzt, mit TG behandelt	4,0	29,6
Magermilch für 5 min bei 92°C erhitzt, mit TG behandelt	5,8	42,3
Magerquark aus nicht erhitzter, TG-behandelter Milch	-	-
Magerquark aus erhitzter (wenige Sekunden bei 72°C), TG-behandelter Milch	5,4	29,5
Magerquark aus erhitzter (5 min bei 92°C), TG-behandelter Milch	7,8	45,1
Magermilchjoghurt mit TG, E/S 1/2000	7,4	54,9
Magermilchjoghurt mit TG, E/S 1/5000	2,8	20,6
Magermilchjoghurt mit TG, E/S 1/10000	3,6	26,9

TG = Transglutaminase, E/S = Enzym-Substrat-Verhältnis

Mit Hilfe der Gelelektrophorese konnten bei der nicht erhitzten Magermilch und der aus dieser hergestellten Quarkprobe keine hochmolekularen Proteinaggregate nachgewiesen werden, die durch Transglutaminase aus Milchproteinen entstehen. Diese Aggregate würden aufgrund ihrer Molekülgröße das Gel nicht durchwandern, sondern an der Probenauftragsstelle liegenbleiben. Bei den stärker erhitzten Milchproben und den aus solcher Milch hergestellten Quarkproben waren bei der SDS-PAGE hochmolekulare Polymere an den Probenauftragstellen der mit Transglutaminase hergestellten Proben deutlich erkennbar (Abb. 4).

Mittels SDS-PAGE und Gelchromatographie konnte in vorangegangenen eigenen Untersuchungen gezeigt werden, daß Rohmilch ein weniger reaktives Substrat für Transglutaminase darstellt als pasteurisierte Milch oder ultrahocherhitzte Milch.

Joghurt, zu dessen Herstellung Milch mit dem Enzym-Substrat-Verhältnis 1:2000 mit Transglutaminase behandelt wurde, enthielt mehr  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin als Joghurtproben, die mit geringeren Enzym-Substrat-Verhältnissen hergestellt wurden. Auch wenn der Joghurt, der mit geringeren Transglutaminasekonzentrationen hergestellt wurde, vergleichbare Gelfestigkeit und Synärese aufwies wie Joghurt, der mit größerer Transglutaminasemenge hergestellt wurde, nahm die Bildung von Isopeptidbindungen mit geringerer Enzymkonzentration ab. Offenbar ist für die Veränderung der genannten technofunktionellen Produkteigenschaften im Vergleich zum nicht-transglutaminase-behandelten Joghurt eine geringe Anzahl von Isopeptidbindungen ausreichend. Über die Untersuchungen der Produktbeschaffenheit des Joghurts wurde bereits berichtet (13).

Die  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalte von Quark und Joghurt mit dem Enzym-Substrat-Verhältnis 1:2000 bei vorheriger Erhitzung der Milch bei 92°C für 5 min waren mit 7,8 nmol/mg Lyophilisat und 7,4 nmol/mg Lyophilisat vergleichbar groß.

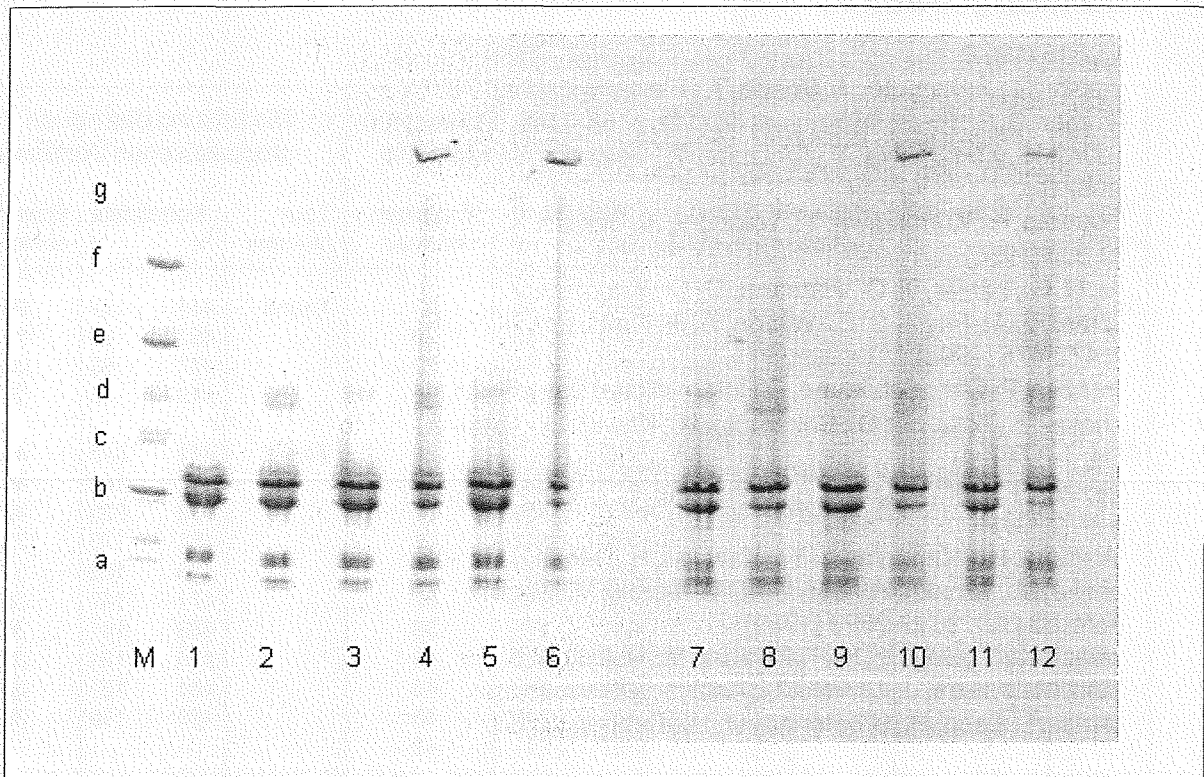


Abb. 4: SDS-PAGE von unterschiedlich vorehitzten Milchproben ohne und mit Transglutaminase und aus diesen hergestellten Quarkproben

Proben 1-6: Magermilch - 1: ohne TG ohne Erhitzung;

2: mit TG ohne Erhitzung

3: ohne TG, wenige Sekunden bei 72°C erhitzt

4: mit TG, wenige Sekunden bei 72°C erhitzt

5: ohne TG, 5 min bei 92°C erhitzt

6: mit TG, 5 min bei 92°C erhitzt

Proben 7-12: Magerquark aus Proben 1-6 hergestellt

(Transglutaminasebehandlung und Erhitzungsbedingungen gleiche Reihenfolge wie Proben 1-6)

M=Standardproben mit bekannter molarer Masse (Amersham International plc, Buckinghamshire, England) Banden a-g (Kilo-Dalton, KD): a = 14,3; b = 21,5; c = 30; d = 46; e = 69; f = 92,5; g = 200KD (Angaben gemäß Hersteller)

## Danksagung

Die Arbeiten wurden aus Mitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e. V. gefördert. Die vorliegende Veröffentlichung enthält Ergebnisse der Dissertation von Annette Mautner, Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät der Universität Kiel. Die Autoren danken Enken Jacobsen und Ernst Johannsen für sorgfältige technische Assistenz und der Firma Ajinomoto für das Transglutaminasepräparat.

## 4. Literatur

- (1) Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H., Motoki, M.: Agric. Biol. Chem. 53(10), 2613-2617 (1989)
- (2) Dickinson, E.: Trends in Food Science & Technology 8, 334-339 (1997)
- (3) Matheis, G., Whitaker, J. R.: J. Food Biochemistry 11, 309-327 (1987)

- (4) Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C., Soeda, T.: J. Food Sci. 62(3), 488-490, 515 (1997)
- (5) Kuraishi, C., Sakamoto, J., Soeda, T.: Fleischwirtschaft 78 (6), 657-658, 660, 702 (1998)
- (6) Hammer, G. F.: Fleischwirtschaft 78 (11), 1155-1156, 1159-1162, 1186 (1998)
- (7) Seguro, K., Kumazawa, Y., Ohtsuka, T., Toiguchi, S., Motoki, M.: J. Food Sci. 60 (2), 305-311 (1995)
- (8) Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Toiguchi, S., Seguro, K., Soeda, T., Motoki, M.: J. Food Sci. 60 (2), 300-304 (1995)
- (9) Lee, H. G., Lanier, T. C., Hamann, D. D., Knopp, J. A.: J. Food Sci. 62 (1), 20-24 (1997)
- (10) Gerrard, J. A., Fayle, S. E., Wilson, A. J., Newberry, M. P., Ross, M., Kavale, S.: J. Food Sci. 63 (3), 472-475 (1998)
- (11) Lorenzen, P. Chr., Schlimme, E.: International Dairy Federation, Bulletin 332, 47-53 (1998)
- (12) Nonaka, M., Toiguchi, S., Sakamoto, H., Kawajiri, H., Soeda, T., Motoki, M.: Food Hydrocolloids 8 (1), 1-8 (1994)
- (13) Lorenzen, P. Chr., Mautner, A., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 51, 89-97 (1999)
- (14) Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Kawajiri, H., Motoki, M.: J. Food Sci. 60 (2), 416-419 (1995)
- (15) Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K., Matsuura, A.: Agric. Biol. Chem. 53 (10), 2619-2623 (1989)
- (16) Kumazawa, Y., Seguro, K., Takamura, M., Motoki, M.: J. Food Sci. 58 (5), 1062-1064, 1083 (1993)
- (17) Griffin, M., Wilson, J., Lorand, L.: Analytical Biochemistry 124, 406-413 (1982)
- (18) Schmitz, I., Zahn, H., Klostermeyer, H., Rabbel, K., Watanabe, K.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 160, 377-381 (1976)
- (19) Lorenzen, P. Chr., Schlimme, E., Roos, N.: Nahrung 42 (3/4), 151-154 (1998)
- (20) VDLUFA Methodenbuch VI, VDLUFA-Verlag, Darmstadt (1996)
- (21) Schlimme, E., Buchheim, W.: Milch und ihre Inhaltsstoffe. Chemische und physikalische Grundlagen, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen, 2. überarb. Aufl. (1999)
- (22) Yasumoto, K., Suzuki, F.: J. Nutr. Sci. Vitaminol. 36, S71-S77 (1990)
- (23) Seguro, K., Kumazawa, Y., Ohtsuka, T., Ide, H., Nio, N., Motoki, M., Kubota, K.: J. Agric. Food Chem. 43, 1977-1981 (1995)
- (24) Anwendungsbroschüren der Firma Ajinomoto Co., Japan
- (25) Ikura, K., Kometani, T., Yoshikawa, M., Sasaki, R., Chiba, H.: Agric. Biol. Chem. 44 (7), 1567-1573 (1980)
- (26) Matsumura, Y., Chanyongvorakul, Y., Kumazawa, Y., Ohtsuka, T., Mori, T.: Biochim. Biophys. Acta 1292, 69-76 (1996)
- (27) Fargemand, M., Otte, J., Qvist, K. B.: Food Hydrocolloids 11 (1), 19-25 (1997)
- (28) Traore, F., Meunier, J.-C.: J. Agric. Food Chem. 40, 399-402 (1992)
- (29) Traore, F., Meunier, J.-C.: J. Agric. Food Chem. 39, 1892-1896 (1991)
- (30) Aboumahmoud, R., Savello, P.: J. Dairy Sci. 73, 256-263 (1990)

## 5. Zusammenfassung

Mautner, A., Meisel, H., Lorenzen, P. Chr., Schlimme, E.: **Bestimmung des Dipeptids  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin aus Transglutaminase-vernetzten Proteinen mittels Aminosäurenanalyse.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 51 (2) 155-163 (1999)

### 24 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin (Enzymatische Quervernetzung, Proteinanalytik)

Aus mit Transglutaminase hergestellten Lebensmittelproben wurde das Dipeptid  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin nach enzymatischer Hydrolyse mittels Aminosäurenanalyse nachgewiesen. Das Dipeptid erscheint im Chromatogramm zwischen Methionin und Isoleucin. Für den Bereich von 1-20 nmol/40  $\mu$ l Aufgabevolumen konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Peakfläche und dem  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalt nachgewiesen werden. Durch den Vergleich der Lysingehalte von enzymatisch abgebautem Caseinat und



enzymatisch abgebautem mit Transglutaminase behandelten Caseinat wurde der Anteil des an der Ausbildung von Isopeptidbindungen beteiligten Lysin mit 1,6 % berechnet. Die in Milch- und Quarkproben gemessenen  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalte bestätigen tendenziell die zuvor mit Hilfe der SDS-PAGE und Gelchromatographie getroffenen Aussagen. Die  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysingehalte von Joghurtproben, die mit unterschiedlichen Transglutaminasemengen hergestellt wurden, unterscheiden sich nicht im gleichen Verhältnis wie die eingesetzten Enzym-Substrat-Verhältnisse.

## Summary

Mautner, A., Meisel, H., Lorenzen, P. Chr., Schlimme, E.: **Determination of the dipeptide  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine in transglutaminase crosslinked proteins by amino acid analysis.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **51**(2) 155-163 (1999)

### 24 $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine (enzymatic crosslinking, protein analysis)

After enzymatic hydrolysis, dipeptide  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine could be detected via amino acid analysis in food samples crosslinked by transglutaminase. The chromatogram showed the dipeptide to be located between methionine and isoleucine. In the range of 1-20 nmol/40  $\mu$ l, a linear correlation between peak area and  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine content could be proved. Comparing the lysine contents of caseinate and of crosslinked caseinate, both enzymatically degraded, the proportion of the lysine incorporated in isopeptide bonds could be determined at 1.6 %. The tendency of the  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine contents measured in milk and quarg samples confirmed the findings previously stated by using SDS-PAGE and gel chromatography. The  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine contents of yoghurt samples incubated with different transglutaminase activities did not correspond to the enzyme-substrate ratio.

## Résumé

Mautner, A., Meisel, H., Lorenzen, P. Chr., Schlimme, E.: **Détermination par analyse d'acides aminés du dipeptide  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine à partir de protéines "crosslinked" par la transglutaminase.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **51**(2) 155-163 (1999)

### 24 $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine ("crosslinking" enzymatique, analyse de protéines)

Après l'hydrolyse enzymatique, le dipeptide  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine a pu être détecté en utilisant l'analyse d'acides aminés dans des échantillons d'aliments "crosslinked" par la transglutaminase. Le chromatogramme a montré que le dipeptide était situé entre la méthionine et l'isoleucine. De 1 à 20 nmol/40  $\mu$ l, il a été possible de prouver une liaison linéaire entre la surface du pic et le contenu de  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine. En comparant le contenu de lysine du caséinate enzymatiquement dégradé et du caséinate "crosslinked" par la transglutaminase, également enzymatiquement dégradé, la proportion de lysine incorporée dans les isopeptides a été fixée à 1,6 %. La tendance des contenus  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine mesurés dans des échantillons de lait et de fromage blanc a confirmé les résultats antérieurs obtenus au moyen de SDS-PAGE et de la chromatographie. La différence  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine relevée dans des échantillons de yaourt, "crosslinked" par des quantités différentes de transglutaminase, ne correspondait pas aux proportions enzyme-substrat utilisées.