

Untersuchungen zur Modifizierung von Casein mit Hilfe der Plasteinreaktion

Von P. Chr. Lorenzen

Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Milchwissenschaft, Kiel

1. Einleitung

Im Rahmen experimenteller Untersuchungen zur Gewinnung phosphopeptidreicher Fraktionen aus Casein wurde festgestellt, daß die Proteolyse von Natrium-Caseinat mit Pankreasproteinasen durch Aggregatbildung zu milchig-weißen Trübungen der Proteinlösungen führt. Die Intensität der Trübung ist von der Art des eingesetzten Enzyms, der Proteolysezeit und dem pH-Wert abhängig (1). Weitergehende Studien haben gezeigt, daß diese Aggregate, die - ähnlich der Aggregation der Caseinmicellen nach Behandlung mit Chymosin (2) - in einer der enzymatischen Spaltung nachgelagerten Sekundärreaktion gebildet werden, weitgehend die gleichen funktionellen und strukturellen Eigenschaften aufweisen wie Plasteine aus Natrium-Caseinat (3). In der Literatur werden Plasteine aber als hochmolekulare Aggregate beschrieben, die als Ergebnis eines dreistufigen Verfahrens erst dann entstehen, wenn konzentrierte Lösungen enzymatisch gewonnener Proteinhydrolysate erneut mit Proteinasen inkubiert werden (4,5). Damit konnte erstmals deutlich gemacht werden, daß als plasteinspezifisch beschriebene Eigenschaften auch an Proteinhydrolysaten meßbar sind, die keiner Plasteinreaktion unterworfen wurden. Jede in vitro-Proteolyse kann also mit plasteinähnlichen Reaktionen verbunden sein. Darüber hinaus ist vorstellbar, daß die während der Fermentation und Reifung proteinreicher Lebensmittel (Käse (6), Sojaprodukte, Fischprodukte, Würze) ablaufenden proteolytischen Vorgänge vergleichbare Reaktionen einschließen.

Plasteine können prinzipiell aus jeder Proteinquelle mit Hilfe jeder Endopeptidase (Proteinase) realisiert werden (7). Untersuchungen, in denen neben Proteinasen auch Exopeptidasen zur Plasteingewinnung eingesetzt wurden, finden sich dagegen in der Literatur nicht. Als potentielle Mechanismen der Plasteinreaktion, die im Jahre 1886 durch Danilewski (8) erstmals beschrieben wurde, werden kovalente Umsetzungen wie die durch Proteinasen katalysierte Transpeptisierung und die Kondensation (9,10), aber auch nichtkovalente Vorgänge wie Ionenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen diskutiert (11,12). In denen während der Plasteinreaktion entstehenden Aggregaten konzentrieren sich hydrophobe Peptide (5), wohingegen überwiegend hydrophile Proteolyseprodukte, wie beispielsweise Phosphopeptide, in kolloider Lösung verbleiben; es erfolgt also eine partielle Fraktionierung der Peptide nach ihrer Hydrophobizität (13).

Die ersten Arbeiten zur Plasteinreaktion beschreiben physiologische Untersuchungen über die Verdauung von Eiweißstoffen (8,14), während die Literatur der vergangenen zwei Dekaden überwiegend Aspekte der Gewinnung funktioneller Ingredienzien darstellt (4,5 und dort zitierte Literatur). Die Betrachtung physiologischer Gesichtspunkte der Plasteinreaktion und seiner Mechanismen, beispielsweise beim Übergang proteinhaltigen Nahrungsbreies aus dem Magen in das Duodenum, ist dabei - möglicherweise zu unrecht - in den Hintergrund des wissenschaftlichen Interesses getreten. Die Untersuchungen zur Gewinnung funktioneller Ingredienzien umfassen prinzipiell vier Themenbereiche:

- (1) Verbesserung oder Standardisierung der Aminosäurezusammensetzung von Proteolysaten durch kovalente Bindung geschützter Aminosäuren an Peptide (5,15).
- (2) Entbitterung von Proteolysaten (5,16).
- (3) Gewinnung thixotroper Plasteingele zur Stabilisierung von Lebensmittelsystemen (7,17).
- (4) Verbesserung technofunktionaler Eigenschaften von Proteolysaten durch kovalente Bindung grenzflächenaktiver Substanzen an Peptide (16,18).

Die vorliegende Arbeit beschreibt Untersuchungen, die thematisch dem ersten Bereich zuzuordnen sind. Im ersten Teil der Arbeit werden Ergebnisse zur kovalenten Bindung geschützter Aminosäuren an Caseinopeptide dargestellt. Im zweiten Teil werden Untersuchungen zur Charakterisierung von Pankreatin-Plasteinen beschrieben, die sowohl im Ein-Phasen-(Wasser) als auch im Zwei-Phasen-(Wasser/Ethanol) System gewonnen wurden. Vorlaufende Untersuchungen zur Gewinnung von Plasteinen mit Pankreatin als physiologischem Enzymsystem (19) haben deutlich gemacht, daß sich in den Pankreatin-Plasteinen stark hydrophobe, tyrosinhaltige Peptide konzentrieren.

2. Material und Methoden

2.1 Methoden zur Gewinnung und Charakterisierung der Plasteine

Die Methoden zur Gewinnung und Charakterisierung der Plasteine wurden an anderer Stelle (1,3,19) bereits im einzelnen beschrieben. Die Ein-Phasen-Plasteinreaktion wurde in Wasser, die Zwei-Phasen-Plasteinreaktion in Wasser/Ethanol (1:1) ausgeführt (Enzymsystem: Pankreatin).

Die Untersuchungen mit Hilfe der Gel-Permeations-Chromatographie wurden nach Sukan und Andrews (17) durchgeführt. Die Charakterisierung der Plasteine mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese erfolgte nach Meisel und Carstens (20).

2.2 Untersuchungen zur kovalenten Bindung geschützter Aminosäuren an Caseinopeptide

Zu 5 Teilen Natrium-Caseinat bzw. Proteolysat (3) wurde jeweils 1 Teil Aminosäure-Ethylester (Met-OEt und Ser-OEt, Fa. Sigma Chemie, Deisenhofen; P-Ser-OEt, hergestellt nach Lorenzen et al. (21)) vor der Proteolyse bzw. der Plastein-Reaktion zugesetzt und die entsprechenden Inkubationen ausgeführt. Zur Charakterisierung des Anteils an kovalent gebundenen Aminosäuren wurden freie und peptidgebundene Aminosäuren analysiert (22). Der Anteil an peptidgebundenen Aminosäuren ergab sich aus der Summe von freien und peptidgebundenen Aminosäuren nach Säurehydrolyse minus dem Anteil an freien Aminosäuren.

2.3 Charakterisierung der Plasteine mittels Dünnschicht-Chromatographie

Materialien: HPTLC Fertigplatten Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator) 10 x 10 cm, Fa. Merck, Darmstadt. α -Nitroso- β -Naphthol, Tyrosin, Fa. Sigma Chemie, Deisenhofen.

Durchführung: Die DC-Platten wurden für 1 h bei 100 °C im Trockenschrank aktiviert. Nach Abkühlung wurden jeweils 3 μ l des Standards (10 mg Tyrosin / 10 ml 0,1 mol/l HCl)

und 2-4µl der Probelösungen (20 mg Plastein/ml DMSO/H₂O (60:40)) aufgetragen. Nach Abtrocknen der Proben wurden die Platten in die mit Fließmittel (Butanol/Aceton/Pyridin/Wasser (20:5:5:10)) gesättigte Kammer gestellt. Nach Abschluß der Chromatographie wurden die Platten getrocknet und mit einem tyrosinspezifischen Reagenz (a) 10 % HNO₃, b) 0,1 % α-Nitroso-β-Naphtol in Ethanol) oder mit Ninhydrin (0,2 % in Aceton) angesprüht.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungen zur kovalenten Bindung geschützter Aminosäuren an Caseinopeptide

Mit Hilfe der Plasteinreaktion ist eine Anreicherung von Proteolyseprodukten mit Aminosäuren möglich, die kovalent terminal an Peptide gebunden werden (15). Dabei liegen in bezug auf den enzymkatalysierten Einbau von Methionin, insbesondere in Proteolysaten aus pflanzlichen Proteinen, die meisten Erfahrungen vor (5,15,23). Hajos et al. (24) führten Untersuchungen zur Anreicherung von Milchproteinhydrolysaten mit Methionin durch. Die Aminosäuren werden nur dann kovalent gebunden, wenn die Carboxylgruppe geschützt (verestert) ist (5). Als potentieller Mechanismus der enzymkatalysierten Bindung geschützter Aminosäuren an Peptide wird die Transpeptisierung (16) angesehen (Abb. 1).

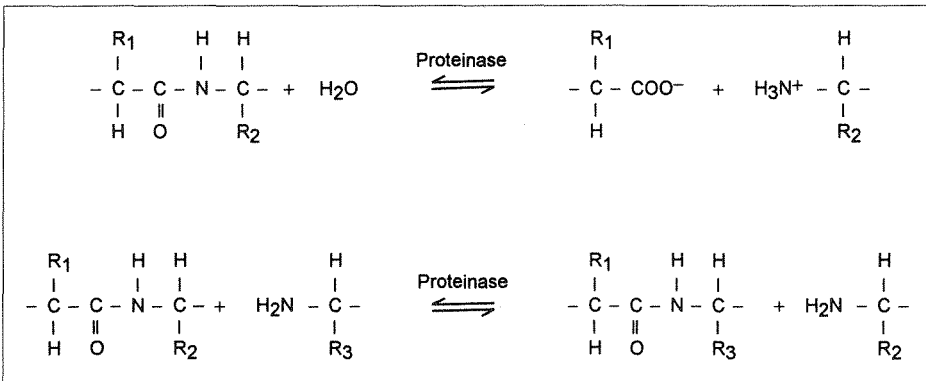


Abb. 1: Schema zur enzymatischen Hydrolyse (oben) und Aminolyse (unten) von Peptidbindungen (nach Adler-Nissen, 1986)

Im oberen Teil der Abbildung 1 ist, in schematisch gekürzter Form, die enzymatische Hydrolyse einer Peptidbindung dargestellt: Nach Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes wird das Peptid mit dem Aminosäurenrest R₂ abgespalten und das Peptid mit dem Aminosäurenrest R₁ auf Wasser als nukleophiles Agens übertragen. Prinzipiell können aber auch freie Aminogruppen von Peptiden oder geschützten Aminosäuren als nukleophiles Agens dienen. In diesem Falle wird das Peptid mit dem Aminosäurenrest R₁ auf die Aminogruppe des Peptides mit dem Aminosäurenrest R₃ oder auf die Aminogruppe einer geschützten Aminosäure übertragen (unterer Teil der Abbildung 1). Die Reaktion wird als Transpeptisierung bezeichnet (15, 16, 25). Unter Transpeptisierung versteht man also die Umlagerung einer Peptidbindung in eine andere (26).

In eigenen Arbeiten wurde versucht, die Aminosäuren Methionin, Serin und Phosphoserin in Form ihrer Ethylester kovalent an Caseinopeptide zu binden. Tabelle 1 stellt das Ergebnis der Untersuchungen dar.

Tab. 1: Gehalte an Methionin, Serin und Phosphoserin in Proteolysaten und Plasteinen ohne (A) bzw. mit (B) enzymkatalysiertem Einbau der entsprechenden Aminosäure-Ethylester (Enzymsystem: Trypsin)

	A (mol %)	B (mol %)	B - A (mol %)
Methionineinbau:			
Proteolysat	0,55	5,67	5,12
Plastein	1,32	3,57	2,25
Serineinbau:			
Proteolysat	3,96	5,40	1,44
Plastein	5,55	8,31	2,76
Phosphoserineinbau: ¹⁾			
Proteolysat	5,47	5,66	0,19
Plastein	5,92	8,10	2,18

¹⁾ Gesamt-Seringehalt nach Hydrolyse mit 6 mol/l HCl

Es zeigt sich, daß die geschützten Aminosäuren sowohl mit Hilfe der Plasteinreaktion (Substratkonzentration: 30 % (w/w)) als auch im Rahmen normaler Proteolyse (Substratkonzentration: 5 % (w/w)) an Caseinopeptide gebunden werden können. Im Rahmen der normalen Proteolyse nimmt die Effizienz des enzymkatalysierten Einbaues mit abnehmender Hydrophobizität der geschützten Aminosäuren vom Methionin bis hin zum Phosphoserin allerdings deutlich ab. Mit Hilfe der Plasteinreaktion dagegen können, unabhängig von der Hydrophobizität der geschützten Aminosäuren, in etwa gleich hohe Einbaugrade erzielt werden. Anhand der vorliegenden Untersuchungen können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob die Bindung der Aminosäuren N- oder C-terminal erfolgt.

In weiteren Untersuchungen soll analysiert werden, ob die enzymkatalysierte Anbindung von Phosphoserin an Caseinopeptide im Rahmen der Herstellung phosphopeptidreicher Präparate von Interesse ist. Für Phosphopeptide werden derzeit Einsatzmöglichkeiten zur Kariesprophylaxe, in der Säuglingsernährung und der Osteoporosebehandlung diskutiert (27,28). Prinzipiell ist die Transpeptisierung zur Gewinnung funktionseller Proteolysate, beispielsweise zur Herstellung grenzflächenaktiver Präparate durch kovalente Anbindung von L-Leucin-n-Alkyl-Ester an Peptide, für die technische Anwendung von Interesse (16,18).

3.2 Untersuchungen zur Charakterisierung von Ein-Phasen- und Zwei-Phasen-Pankreatin-Plasteinen

Untersuchungen zur Gewinnung von Plasteinen mit Pankreatin als physiologischem Enzymsystem (Ein-Phasen-System) haben gezeigt, daß sich in den Pankreatin-Plasteinen stark hydrophobe, tyrosinhaltige Peptide konzentrieren (19). In der vorliegenden Arbeit wurde die Plasteinreaktion nicht nur im Ein-Phasen-(Wasser) sondern auch im Zwei-Phasen-(Wasser/Ethanol) System ausgeführt, um die Häufigkeit der Transpeptisierungsreaktionen als Initialschritt der Plasteinreaktion (siehe Abschnitt 3.1) zu erhöhen. Im Rahmen enzymkatalysierter Umsetzungen während der Plasteinreaktion stehen Wasser (Hydrolyse) und freie Aminogruppen (Transpeptisierung → Aminolyse) als nukleophile Agenzien im Wettbewerb. Neben hohen Substratkonzentrationen - wie sie bei

der Plasteinreaktion gegeben sind - kann ein partieller Austausch des Wassers gegen organische Lösemittel (Ethanol, Aceton) Transpeptisierungsreaktionen begünstigen und damit Hydrolysereaktionen zurückdrängen (5,26). Darüber hinaus verringert ein Zusatz organischer Lösemittel die Löslichkeit der entstandenen Aggregate, so daß sie präzipitieren und damit aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden (29).

Zur Beschreibung der Eigenschaften der Pankreatin-Plasteine wurde die Fähigkeit verschiedener Reagenzien zur Auflösung der entstandenen Aggregate untersucht (Tab. 2a). Zum Vergleich sind in Tabelle 2b die entsprechenden Daten der Serinproteinasen-Plasteine wiedergegeben (19). Die Prozentangaben beziehen sich auf die Trübung der Aggregate in Wasser (pH 7,8 = 100%).

Tab. 2a: Fähigkeit verschiedener Reagenzien zur Auflösung der Plastein-Aggregate im Vergleich zu Natrium-Caseinat (Enzymsystem: Pankreatin)

	Trübung (%)*		
	Natrium-Caseinat	Ein-Phasen-Plasteine	Zwei-Phasen-Plasteine
Wasser, pH 7,8	100	100	100
Harnstoff, 8 mol/l	12	13	10
NaCl, 2 mol/l	77	> 100	> 100
EDTA, 0,5 mol/l	100	74	72
SDS, 5 %	> 100	50	43
TCA, 10 %	> 100	69	76
TCA, 50 %	> 100	21	8
Milchsäure, 50 %	35	14	7
Citronensäure, 50 %	14	11	5
Essigsäure, 50 %	39	18	8
Ethanol, 70 vol %	> 100	79	> 100
Aceton, 70 vol %	> 100	> 100	> 100

* Bezogen auf die Trübung ($\lambda = 900$ nm) der Plasteine bzw. des Natrium-Caseinats in Wasser, pH 7,8 = 100 %

Es zeigt sich, daß der Zusatz von Natriumchlorid und 10%iger Trichloressigsäure (TCA), die schwache Ionenbindungen lösen können, bei den Plasteinen nicht (Tab. 2b) bzw. nur zu einem geringen Teil (Tab. 2a) zur Auflösung der Aggregate führt. Inbezug auf die Natrium-Caseinat-Lösung stellt sich dieses umgekehrt dar. Der Zusatz von Säuren in einer Konzentration von 50 % (TCA, Milchsäure, Citronensäure, Essigsäure) führt

Tab. 2b: Fähigkeit verschiedener Reagenzien zur Auflösung der Serinproteinasen-Plasteine (19)

	Trübung (%)*		
	Trypsin-Plasteine	Chymotrypsin-Plasteine	Trypsin-Chymotrypsin-Plasteine
Wasser, pH 7,8	100	100	100
Harnstoff, 8 mol/l	7	7	7
NaCl, 2 mol/l	> 100	> 100	> 100
EDTA, 0,5 mol/l	87	59	62
SDS, 5 %	2	12	8
TCA, 10 %	> 100	> 100	> 100
TCA, 50 %	7	2	3
Milchsäure, 50 %	1	3	7
Citronensäure, 50 %	1	2	3
Essigsäure, 50 %	1	4	9
Ethanol, 70 vol %	56	65	23
Aceton, 70 vol %	73	78	29

* Bezogen auf die Trübung ($\lambda = 900$ nm) der Plasteine in Wasser, pH 7,8 = 100 %

bei den Plasteinen und, mit Ausnahme der TCA, auch bei Natrium-Caseinat-Lösungen zur weitgehenden Auflösung der Aggregate. Die Unlöslichkeit in 10%iger TCA und die weitgehende Auflösung der Aggregate in 50%iger TCA gilt als ein Parameter zur Beschreibung von Plasteinen (3).

Wenn die Aggregate bzw. Natrium-Caseinat in Harnstoff- oder SDS-Lösungen eingebracht werden, die hydrophobe Bindungen zu lösen vermögen, stellt sich das Bild differenzierter dar. Während Harnstoff die Aggregate weitgehend auflöst, sind die Pankreatin-Plasteine in 5%iger SDS-Lösung nur zum Teil auflösbar (Tab. 2a); die durch Natrium-Caseinat hervorgerufene Trübung wird nicht vermindert. Serinproteinasen-Plasteine lösen sich, wie Tabelle 2b zeigt, in 5%iger SDS-Lösung dagegen vollständig auf. Gegenüber Ethanol und Aceton (lösen schwache hydrophobe Bindungen) zeigen sowohl die Pankreatin-Plasteine als auch Natrium-Caseinat – im Vergleich zu den Serinproteinasen-Plasteinen – eine hohe Stabilität.

In Tabelle 3a sind strukturelle Parameter der Pankreatin-Plasteine im Vergleich zum Natrium-Caseinat dargestellt. In Tabelle 3b sind zum Vergleich die entsprechenden Werte der Serinproteinasen-Plasteine wiedergegeben (19).

Als Maßzahl zur Kennzeichnung der mittleren relativen Kettenlänge der Peptide wurde der Quotient ($F_{exp.}$) aus der Summe der OPA-sensitiven Aminogruppen nach und vor salzsaurer Hydrolyse bestimmt. Dabei wurden für die Ein-Phasen- bzw. Zwei-Phasen-Pankreatin-Plasteine mit 1,5 bzw. 1,6 identische mittlere relative Kettenlängen gefunden (Tab. 3a). Nach Untersuchungen von Frister et al. (30) entsprechen diese Werte relativen Kettenlängen von Dipeptiden ($F_{exp.}$ der Testsubstanz: Glu-Lys = 1,4) bis Tripeptiden ($F_{exp.}$ der Testsubstanz: Thr-Lys-Tyr = 1,9). Die Peptide der Serinproteinasen-Plasteine weisen mittlere relative Kettenlängen von 6,4 - 10,4 auf (Tab. 3b). Charakteristisch, und für Plasteine typisch, sind die - gegenüber Natrium-Caseinat - deutlich erhöhten Gehalte an hydrophoben Aminosäuren. Im Unterschied zu Serinproteinasen-Plasteinen zeichnen sich Pankreatin-Plasteine aber insbesondere dadurch aus, daß sie zu mehr als einem Drittel aus Tyrosin bestehen. Dabei konzentrieren sich in den Ein-Phasen-Plasteinen mehr als drei Viertel (78,06 mol%) und in den Zwei-Phasen-Plasteinen - bei geringerer Plasteinausbeute - ca. die Hälfte (53,89 mol%) des Tyrosins, das über die Proteolysate in die Plasteinreaktion eingebracht wurde. Möglicherweise können damit aus Pankreatin-Plasteinen Präparate gewonnen werden, die in der Ernährung von Patienten mit Phenylketonurie (siehe Yamashita et al., 31) einsetzbar sind.

Tab. 3a: Strukturelle Parameter von Ein-Phasen- und Zwei-Phasen-Plasteinen im Vergleich zu Natrium-Caseinat (Enzymsystem: Pankreatin)

	Natrium-Caseinat	Ein-Phasen-Plasteine	Zwei-Phasen-Plasteine
Plasteinausbeute (% (w/w))	–	9,32	8,04
Relative Kettenlänge ($F_{exp.}$)	13,3	1,6	1,5
Hydrophile Aminosäuren (mol %)	45,57	27,90	27,10
Hydrophobe Aminosäuren (mol %)	51,46	65,40	65,77
Tyrosingehalt (mol %)	3,76	35,14	34,40
Plasteintyrosin ¹⁾ (mol %)	–	78,06	53,89

¹⁾ bezogen auf den Gesamttyrosingehalt im Proteolysat, das zur Plasteinreaktion eingesetzt wurde

Tab. 3b: Strukturelle Parameter von Serinproteinasen-Plasteinen (19)

	Trypsin-Plasteine	Chymotrypsin-Plasteine	Trypsin-Chymotrypsin-Plasteine
Plasteinausbeute (% (w/w))	39,85	7,59	7,18
Relative Kettenlänge (F _{exp.})	10,4	8,9	6,4
Hydrophile Aminosäuren (mol %)	33,67	32,68	31,44
Hydrophobe Aminosäuren (mol %)	55,84	58,65	60,88
Tyrosingehalt (mol %)	5,45	5,99	5,63
Plasteintyrosin ¹⁾ (mol %)	47,55	15,42	12,95

¹⁾ bezogen auf den Gesamttyrosingehalt im Proteolysat, das zur Plasteinreaktion eingesetzt wurde

In Abbildung 2 sind die Ergebnisse der Untersuchungen an Pankreatin-Plasteinen mit Hilfe der Gel-Permeations-Chromatographie dargestellt.

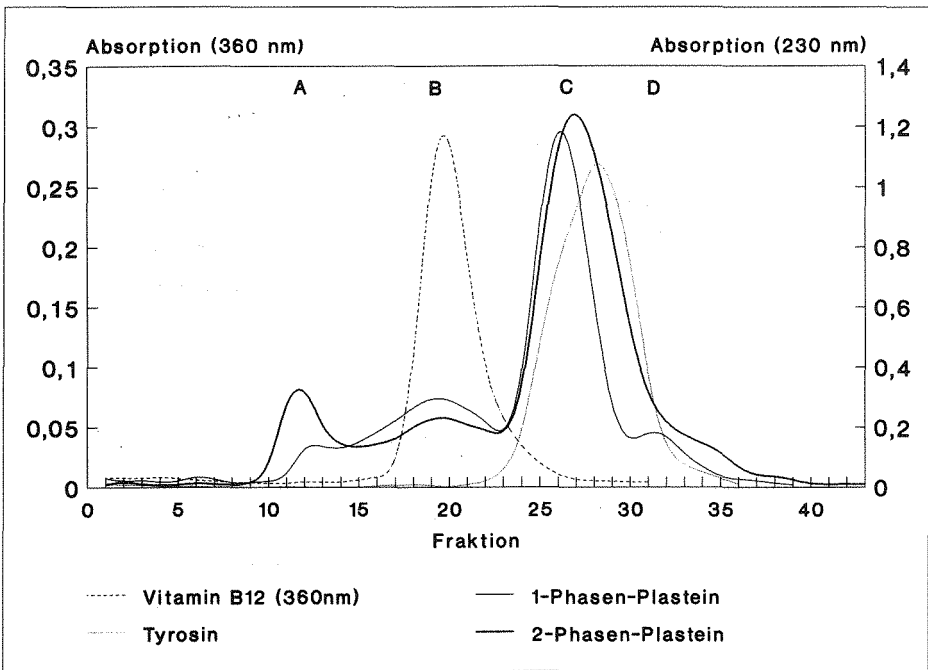


Abb. 2: Gel-Permeations-Chromatogramme von Ein-Phasen- und Zwei-Phasen-Pankreatin-Plasteinen, Gel: Sephadex G25, Proben: 18,3 mg Plastein in 2 ml Puffer, Elution: 0,2 mol Natriumphosphat Puffer in 8 mol/l Harnstoff, pH 8,0, Flußrate 5 ml/h, Standards: Vitamin B12 (0,2 mg/2 ml), Tyrosin (3 mg/2 ml)

Grundsätzlich weisen die Chromatogramme der Ein-Phasen- und Zwei-Phasen-Plasteine vier Peaks bzw. Schultern auf. Die Peaks A kennzeichnen das Ausschlußvolumen des zur Chromatographie verwendeten Gels (Sephadex G25: Proteolyseprodukte mit Molmassen > 5000 g/mol). Es zeigt sich, daß Zwei-Phasen-Plasteine einen deutlich

höheren Anteil an Plasteinmaterial mit Molmassen > 5000 g/mol aufweisen als Ein-Phasen-Plasteine. Die Peaks B beinhalten Peptide mit Molmassen von ca. 1000 - 1500 g/mol (Standard: Vitamin B12 = 1355 g/mol). Mit den Peaks C, die, gemessen an den Flächen unter den Kurven mengenmäßig den größten Anteil des Plasteinmaterials enthalten, werden Di- bzw. Tri-Peptide und möglicherweise auch freie Aminosäuren größerer Molmassen eluiert. Mit den Peaks D werden entsprechend freie Aminosäuren kleinerer Molmassen eluiert.

Zur Charakterisierung der Plasteine mittels Dünnschichtchromatographie wurden die nach Auftrennen erhaltenen Banden der Plastein-Peptide entweder mit einem tyrosin-spezifischen Reagenz (Abb. 3a) oder mit Ninhydrin (Abb. 3b) sichtbar gemacht.

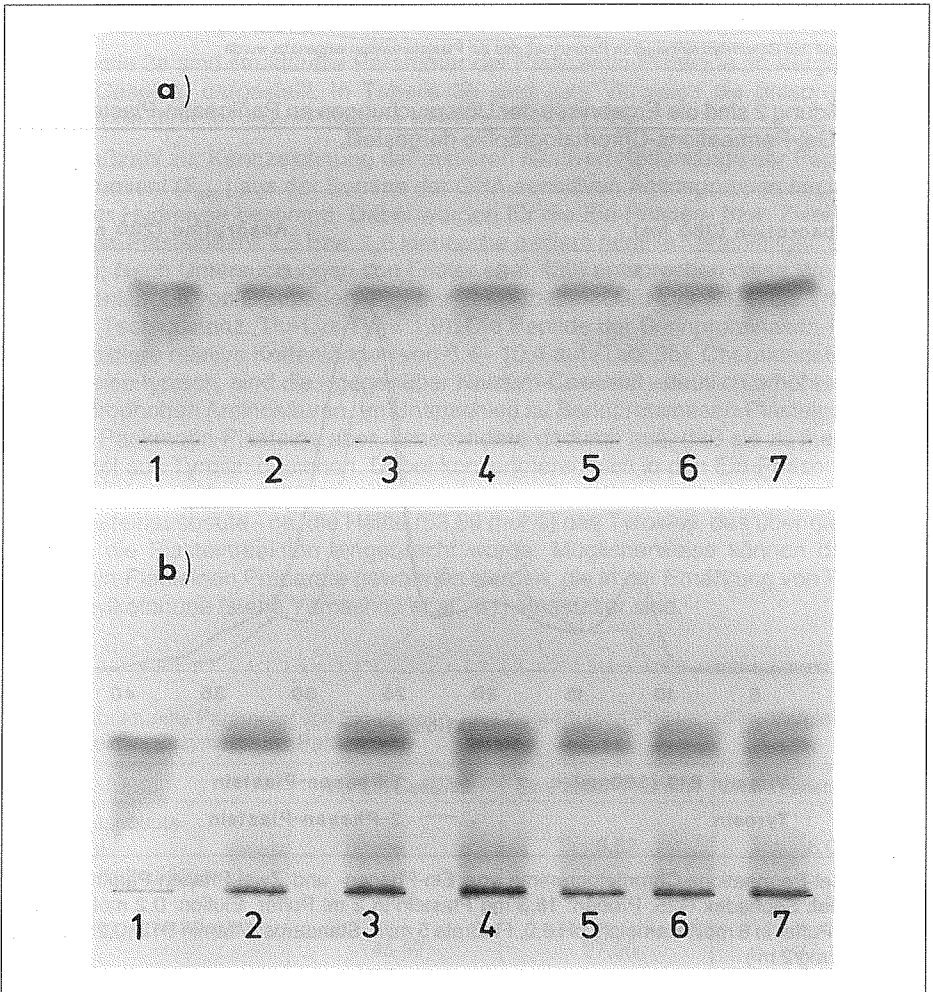


Abb. 3: Dünnschicht-Chromatogramme von Ein-Phasen- und Zwei-Phasen-Pankreatin-Plasteinen (nähere Angaben siehe Kapitel 2: Material und Methoden)

a) Färbung mit α -Nitroso- β -Naphtol, b) Färbung mit Ninhydrin,
 Proben: 1 = Tyrosin, 2-4 = Ein-Phasen-Plasteine, 5-7 = Zwei-Phasen-Plasteine

Die Abbildungen 3a und 3b machen deutlich, daß die Plastein-Peptide einen hohen Anteil an Tyrosin enthalten und bestätigen damit die Ergebnisse der Aminosäureanalyse (siehe Tabelle 3a). Aus Abbildung 3b ist darüber hinaus ersichtlich, daß die Plasteine auch nichttyrosinhaltige Peptide enthalten. Unterschiede in der qualitativen Zusammensetzung zwischen Ein-Phasen- und Zwei-Phasen-Plasteinen lassen sich mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie nicht nachweisen.

Abschließend sind in Abbildung 4 die Elektropherogramme der Plasteine im Vergleich zum Proteolysat, das zur Plasteingewinnung eingesetzt wurde, dargestellt. Als Standard dient Natrium-Caseinat.

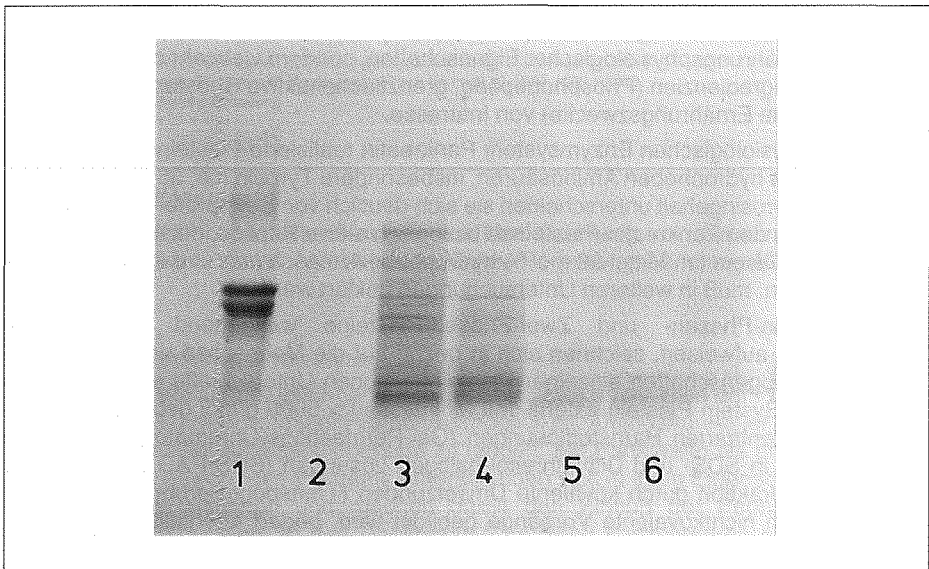


Abb. 4: Elektropherogramme von Ein-Phasen- und Zwei-Phasen-Pankreatin-Plasteinen im Vergleich mit dem zur Plasteingewinnung eingesetzten Proteolysat und Natrium-Caseinat, SDS-Elektrophorese nach Meisel und Carstens (20), Proben: 1 = Natrium-Caseinat, 2 = Proteolysat, 3-4 = Zwei-Phasen-Plasteine, 5-6 = Ein-Phasen-Plasteine

Es ist erkennbar, daß sich die Peptide des Proteolysats nicht, und die Peptide der Ein-Phasen-Plasteine nur in geringem Maße fixieren und anfärben lassen. Sukan und Andrews (17) fanden ebenfalls nur geringe Unterschiede zwischen dem elektrophoretischen Verhalten von Proteolysaten und Plasteinen (Ein-Phasen-System). Bei der in der vorliegenden Arbeit genutzten Methodik der SDS-PAGE sind Proteolyseprodukte ab Molmassen von ca. 5000 g/mol fixier- und anfärbbar (32). Die Untersuchungen mit Hilfe der Gel-Permeations-Chromatographie (s. Abb. 2) haben gezeigt, daß Ein-Phasen-Plasteine mit ca. 5% (Fläche unter der Kurve) nur einen geringen Anteil an Plasteinmaterial mit Molmassen > 5000 g/mol enthalten. Die Elektropherogramme der Zwei-Phasen-Plasteine weisen dagegen ausgeprägte Bandenmuster auf. Der höhere Gehalt an Plasteinmaterial mit Molmassen > 5000 g/mol (ca. 10 %) kann dafür aber nur partiell verantwortlich sein. Vielmehr scheint das Verfahren zur Plasteingewinnung (Ein- bzw. Zwei-Phasen-System) einen Einfluß auf die resultierende Zusammensetzung und damit auf die elektrophoretischen Eigenschaften der Aggregate auszuüben. Durch einen partiellen Austausch des Wassers gegen Ethanol im Zwei-Phasen-System werden freie Amino-

gruppen als nukleophile Agenzien möglicherweise nicht nur quantitativ, sondern über eine enzymatische Veresterung der Carboxylgruppen freier Aminosäuren mit Ethanol auch qualitativ begünstigt, und damit kovalente Umsetzungen gefördert. Aber auch nichtkovalente Vorgänge, insbesondere hydrophobe Wechselwirkungen, kommen als Ursache für die Bildung von Plasteinfraktionen mit hohen Molmassen in Betracht.

4. Schlußfolgerungen

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß es mit Hilfe der Plasteinreaktion, aber auch im Rahmen normaler Proteolyse möglich ist, geschützte Aminosäuren kovalent an Peptide zu binden. In bezug auf Milchproteinhydrolysate ist dabei nicht primär die Verbesserung ernährungsphysiologischer Eigenschaften, sondern vielmehr die Gewinnung funktioneller Ingredienzien (Phosphopeptide, grenzflächenaktive Substanzen, Präparate für bestimmte Ernährungszwecke) von Interesse.

Mit dem physiologischen Enzymsystem Pankreatin realisierte Plasteine bestehen zu zwei Drittel aus hydrophoben Aminosäuren, insbesondere Tyrosin (ca. 35 mol %). In bezug auf den Tyrosingehalt unterscheiden sie sich deutlich von Serinproteinasen-Plasteinen. Ob sich in den Pankreatin-Plasteinen biologisch aktive Peptide, beispielsweise Caxoxine aus k-Casein (im Mittel 68 mol % hydrophobe Aminosäuren und 40 mol % Tyrosin), anreichern, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Obwohl Ein-Phasen- und Zwei-Phasen-Plasteine weitgehend vergleichbare Eigenschaften aufweisen, zeichnen sich in bezug auf die Molmassen und die elektro-phoretischen Eigenschaften einzelner Plasteinfraktionen Unterschiede ab. So wird im Zwei-Phasen-System Plasteinmaterial mit Molmassen > 5000 g/mol gebildet, das sich weder in konzentrierten Harnstofflösungen (Gel-Permeations-Chromatographie) noch durch Kochen in SDS- und Dithiothreitol-haltigen Lösungen (SDS-PAGE) auflöst. Ob diese Plasteinfraktion durch kovalente Umsetzungen (Transpeptisierung, Kondensation) oder durch nichtkovalente Vorgänge gebildet wird, bedarf ebenfalls weiterer Abklärung.

Danksagung

Frau B. Piepenburg und Herrn F. Malien danke ich für technische Mitarbeit bei der Durchführung der Untersuchungen. Herrn Professor E. Schlimme danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

5. Literatur

- (1) Lorenzen, P.Chr., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **42** (4) 553-563 (1990)
- (2) Dalgleish, D.G.: Journal of Dairy Research **46** 653-661 (1979)
- (3) Lorenzen, P.Chr., Schlimme, E.: Milchwissenschaft **47** (8) 499-504 (1992)
- (4) Nakai, S., Li-Chan, E.: In: Developments in Dairy Chemistry - 4 363-365 (1989) (Ed. Fox, P.F.) Elsevier Applied Science, London, New York
- (5) Watanabe, M., Arai, S.: In: Developments in Food Proteins - 6 179-217 (1988) (Ed. Hudson, B.J.F.) Elsevier Applied Science, London, New York
- (6) Haertlé, T., Schlimme, E.: persönliche Mitteilung
- (7) Belikov, V.M., Gololobov, M.Y.: Die Nahrung **30** (3/4) 281-287 (1986)
- (8) Danilewski, A., zitiert nach Henrigues, U. und Gjaldbak, T.K.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **71** 485-517 (1911)
- (9) Fujimaki, M., Arai, S., Yamashita, M.: Adv. Chemistry Ser. **160** 156-184 (1977)
- (10) Gololobov, M.Y., Belikov, V.M., Vitt, S.V., Paskonova, E.A., Titove, E.F.: Die Nahrung **25** (10) 961-967 (1981)
- (11) Andrews, A.T., Alichanidis, E.: Food Chemistry **35** 243-261 (1990)
- (12) v. Hofsten, B., Lalsidis, G.: J. Agric. Food Chem. **24** (3) 460-465 (1976)
- (13) Lorenzen, P.Chr.: unveröffentlichte Ergebnisse
- (14) Sawjalow, W.W.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **54** 119-150 (1907)

- (15) Winkler, H., Nötzold, H., Ludwig, E.: Die Nahrung **28** (10) 1029-1035 (1984)
- (16) Adler-Nissen, J.: Enzymic Hydrolysis of Food Proteins (1986) Elsevier Applied Science, London, New York
- (17) Sukan, G., Andrews, A.: Journal of Dairy Research **49** 279-293 (1982)
- (18) Watanabe, M., Arai, S.: In: Modification of Proteins 199-221 (1982) (Eds. Feeney, R.E., Whitaker, J.R.) American Chemical Society, Washington DC
- (19) Lorenzen, P.Chr., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **45** (3) 197-204 (1993)
- (20) Meisel, H., Carstens, J.: Milchwissenschaft **44** (5) 271-276 (1989)
- (21) Lorenzen, P.Chr., Martin, D., Schlimme, E.: In Vorbereitung
- (22) Meisel, H., Frister, H.: Biol. Chem. Hoppe Seyler **389** 1275-1279 (1988)
- (23) Fujimaki, M.: Ann. Nutr. Alim. **32** 233-241 (1978)
- (24) Hajos, G.Y., Elias, J., Halasz, A.: Journal of Food Science **53** (3) 739-742 (1988)
- (25) Gololobov, M.Y., Antonova, T.V., Belikov, V.M.: Die Nahrung **30** (3/4) 289-294 (1986)
- (26) Jakubke, H.-D., Kuhl, P.: Pharmazie **37** 89-106 (1982)
- (27) Meisel, H., Frister, H., Schlimme, E.: Z. Ernährungswiss. **28** 267-278 (1989)
- (28) Reynolds, E.C.: PCT International Patent Application WO92/18526A1 (1992)
- (29) Phillips, R.D., Beuchat, L.R.: In: Protein Functionality in Foods 275-298 (1981) (Ed. Cherry, J.P.) American Chemical Society, Washington DC
- (30) Frister, H., Meisel, H., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **41** (4) 237-242 (1989)
- (31) Yamashita, M., Arai, S., Fujimaki, M.: Journal of Food Science **41** 1029-1032 (1976)
- (32) Meisel, H.: persönliche Mitteilung

6. Zusammenfassung

Lorenzen, P.Chr.: **Untersuchungen zur Modifizierung von Casein mit Hilfe der Plasteinreaktion.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **46** (2) 179-190 (1994).

24 Plastein-Reaktion (Proteolyse)

Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß es mit Hilfe der Plasteinreaktion, aber auch im Rahmen normaler Proteolyse möglich ist, Aminosäureester (Met-, Ser- und PSer-OEt) kovalent an Caseinopeptide zu binden. Mit Pankreatin als physiologischem Enzymsystem gewonnene Plasteine unterscheiden sich in ihren Eigenschaften von Serinproteinase-Plasteinen und machen damit den Einfluß der Peptidasen auf die Plasteinbildung deutlich. In den Pankreatin-Plasteinen konzentrieren sich proteolyse-resistente Peptide, die zu zwei Drittel aus hydrophoben Aminosäuren, insbesondere Tyrosin (ca. 35 mol %), bestehen. Ein-Phasen- und Zwei-Phasen-Pankreatin-Plasteine weisen weitgehend vergleichbare Eigenschaften auf. Unterschiede zeichnen sich in bezug auf die Molmassenverteilung ab. So wird im Zwei-Phasen-System (Ethanol/Wasser) Plasteinmaterial mit Molmassen > 5000 g/mol gebildet, das sich weder in konzentrierten Harnstofflösungen noch durch Kochen in SDS- und Dithiothreitol-haltigen Lösungen auflöst.

Summary

Lorenzen, P.Chr.: **Studies on the modification of casein by the plastein reaction.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **46** (2) 179-190 (1994)

24 Plastein reaction (proteolysis)

Experiments have shown that covalent binding of amino acid ethyl ester (Met-, Ser-, and PSer-OEt) to caseinopeptides is possible by means of the plastein reaction and also in the course of simple proteolysis. The properties of plasteins obtained with pancreatin as a physiological enzyme system differ markedly from serine proteinase plasteins reflecting the influence of peptidasen on plastein formation. Proteolysis-resistant peptides are concentrated within pancreatin plasteins, which consist to two thirds of hydrophobic

amino acids especially tyrosine (approx. 35 mol %). One-phase and two-phase pancreatin plasteins exhibit almost identical functional and structural properties. Differences in the distribution of peptide molecular weights are particularly apparent. In the two-phase system (ethanol/water) plastein material with a molar mass > 5000 g/mol is formed, that is not dissolved by 8 mol/l urea or by boiling in solutions containing SDS- and dithiothreitol.

Résumé

Lorenzen, P.Chr.: **Etudes de la modification de la caséine à l'aide de la réaction de plastéine.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **46** (2) 179–190 (1994)

24 Réaction de plastéine (protéolyse)

Des études ont montré qu'il est possible de lier des esters d'acide aminé (Met-, Ser- et P-Ser-OEt) de façon covalente aux caséinopeptides à l'aide de la réaction de plastéine, mais aussi par la protéolyse normale. Par rapport à leurs propriétés des plastéines obtenues avec de la pancréatine comme système enzymatique physiologique diffèrent considérablement des plastéines de protéinases de sérine, ce qui reflète l'influence des peptidases sur la formation de plastéines. Des peptides résistant à la protéolyse sont concentrés dans des plastéines de pancréatine qui se composent à deux tiers des acides aminés hydrophobes, et surtout de la tyrosine (à peu près 35 mol %). Des plastéines de pancréatine produit dans le système monophasé ou diphasé ont des propriétés fonctionnelles et structurelles qui sont à peu près identiques. Des différences concernent surtout la distribution du poids molaire. Dans le système diphasé (éthanol/eau) de la plastéine d'un poids molaire de >5000 g/mol est formée qui n'est ni dissoute dans des solutions concentrées d'urée, ni en la bouillant dans des solutions contenant SDS et dithiothreitol.