

VERÄNDERUNGEN VON PROTEINEN DURCH THERMISCHE EINWIRKUNGEN UND MAILLARD-REAKTION*

Von

U. FREIMUTH**

Sektion Chemie der Technischen Universität, Dresden

Für die Ernährung der Menschen und der Tiere sind die Eiweißkörper unentbehrliche Bestandteile der Nahrung. Ihre wirtschaftliche und wissenschaftliche Bedeutung ist daher besonders groß. Wenn auch von den zugeführten Kalorien nur etwa 15% auf die Proteine entfallen, während die Fette rund 40% liefern, ist es trotzdem häufig schwierig, die erforderliche Eiweißmenge bereitzustellen. Der Gesamtbedarf an Proteinen für die Weltbevölkerung wird auf 60 Mill. Tonnen Eiweiß im Jahre geschätzt. Dabei decken $\frac{3}{4}$ der Menschheit ihren Bedarf an Eiweiß zu 80 bis 90% durch pflanzliche Proteine, besonders durch das Eiweiß der Körnerfrüchte. Bis um die Mitte des vorigen Jahrhunderts war dies auch noch in Europa der Fall. In allen hochindustrialisierten Ländern hat sich in den letzten 100 Jahren eine Steigerung des Verbrauches an tierischen Proteinen entwickelt, wobei dem Verbraucher hier pro Tag ungefähr 50 g tierisches Eiweiß zur Verfügung stehen. Dagegen ist es besorgniserregend, daß in den früheren Kolonialgebieten und sogenannten Entwicklungsländern oft weniger als 10 g tierisches Protein pro Tag verfügbar sind. Dadurch kann es zu gefährlichen Mangelzuständen kommen, die besonders für afrikanische und südamerikanische Gebiete unter dem Namen Kwashiorkor bekanntgeworden sind.

Das tierische Eiweiß deckt in ausreichendem Maße den Bedarf an den essentiellen Aminosäuren, wie Tryptophan, Methionin und Lysin. Wenn aber die Eiweißversorgung vorwiegend auf pflanzlichen Proteinen beruht, können sich fehlende oder in geringer Menge vorhandene essentielle Aminosäuren als limitierende Faktoren auswirken und gegebenenfalls Mangelzustände herbeiführen. Vor allem gilt dies für das Lysin, das häufig den begrenzenden Nahrungsfaktor darstellt [1]. Da die Proteine des Weizens und ebenso des Reis und Mais und der Kartoffel relativ lysinarm sind, haben sie einen entsprechend niedrigen biologischen Wert. Auch für den Einsatz des Baumwollsaatproteins in der menschlichen Ernährung spielt das Lysindefizit in diesem Eiweiß eine ähnliche Rolle.

* Vortrag gehalten an der wissenschaftlichen Tagung anlässlich der Hundertjahrfeier der Fakultät für Chemie der Technischen Universität Budapest, 7—9 Oktober, 1971.

** Nach Untersuchungen mit K. MATTHIES, A. TRÜBSBACH, D. HÜBNER und W. KRAUSE.

I. Verminderung des Lysingehaltes

Wegen der Reaktionsfähigkeit der ε -Aminogruppe des Lysins können außerdem durch technologische Maßnahmen, wie etwa durch den Backprozeß oder eventuell auch durch das Pökeln von Fleisch, Verluste von Lysin ausgelöst werden, die den biologischen Wert des Proteins weiter vermindern. Dabei ist zu unterscheiden zwischen einer Zerstörung des Lysins durch chemischen Abbau und einer Blockierung, die es für den enzymatischen Angriff unzugänglich macht. Das in normaler Form vorhandene Lysin läßt sich als »zugängliches Lysin« durch Umsetzung mit SANGERS Reagens (Dinitrofluorbenzol) erfassen, wobei die quantitative Bestimmung des Umsatzes nach Isolierung des in ε -Stellung substituierten Lysins polarographisch oder spektrophotometrisch durchgeführt werden kann.

Die wichtigste und wahrscheinlich auch häufigste Schädigung des Lysins wird durch die Umsetzung der Eiweißkörper mit den fast immer anwesenden reduzierenden Zuckern ausgelöst, wobei sich die vielfach untersuchten Reaktionsabläufe der MAILLARD-Reaktion abspielen (2, 3). Schon bei verhältnismäßig niedrigen Temperaturen (30–40°) und noch bei sehr niedrigen Feuchtigkeitsgehalten (6–15%) kann es zu durchgreifenden Reaktionen kommen. Auch bei der Herstellung von Sprüh- oder Walzenmilch können bereits die Umsetzungen der MAILLARD-Reaktion erfolgen und — wie bereits vor Jahren von K. LANG gezeigt worden ist — zu einer erheblichen Blockierung oder Zerstörung des Lysins führen.

Ausgehend von den grundlegenden Untersuchungen von LEA und HANNAN [4] wurden mit TRÜBSBACH 1968 entsprechende Modellversuche angestellt. Um diese komplizierten Reaktionen unter möglichst übersichtlichen Bedingungen untersuchen zu können, verwendeten wir die Eiweißbestandteile der Milch in isolierter bzw. kristallisierter Form. Dabei setzten wir die zu untersuchenden Proteine nicht mit Glucose um, wie dies für Modellversuche meist geschieht, sondern mit Lactose, um Aussagen für das Verhalten im Milchpulver zu gewinnen. Die maximale Wirkung durch den reduzierenden Zucker liegt nach Angaben der Literatur bei einem Verhältnis drei Kohlenhydrateinheiten zu einer NH_2 -Gruppe [5]. Die Mischungen der Eiweißkörper mit Lactose enthielten 10% Feuchtigkeit und wurden unter Stickstoff abgefüllt und verschiedene Zeiten erhitzt.

Tab. 1 zeigt das verfügbare Lysin in Milchproteinen nach Erhitzung mit 4 Mol Lactose pro 1 Mol Protein, berechnet als Aminosäurereste pro Eiweißmoleküle. Aus den Werten der Tab. 1 ist erkennbar, daß die Verluste an Lysin nach einer 4-stündigen Erhitzung auf 96° bei den 4 untersuchten Milchproteinen verschieden groß sind. Der höchste Verlust bei den untersuchten Caseinfractionen ist im α_S -Casein mit 59,6% festzustellen, während das β -Lactoglobulin einen Verlust von 62% aufweist. Im Gesamtcasein (Säuer-

casein) tritt ein Verlust von rund 44% ein, während das β -Casein nur 36% seiner Lysinreste durch Blockierung einbüßt.

Da β -Lactoglobulin von den Milchproteinen den höchsten Gehalt an Lysin aufweist, wurde es als Modells substanz für weitere Untersuchungen benutzt [6].

Tabelle 1
Verfügbares Lysin in verschiedenen Milchproteinen nach Erhitzung mit 4 Mol Lactose/1 Mol NH_2 -Gruppe

Protein	Verfügbares Lysin nach Erhitzung		Verlust %
	unbehandelt	4 h, 96 °C	
Gesamtcasein	14,7	8,2	43,4
α -Casein	12,4	5,0	59,6
β -Casein	9,7	6,2	36,0
β -Lactoglobulin	30,1	11,3	62,5

$$\text{Lysingehalt: } \frac{\text{Mol Lysin(-Rest)}}{\text{Mol Protein}}$$

Tabelle 2

Verfügbares Lysin in β -Lactoglobulin nach Erhitzung mit 4 Mol Lactose/1 Mol Protein

Erhitzung		Gesamtlysin		Verfügbares Lysin		Verlust** %
Temperatur	Zeit	Gehalt	Verlust %	polarographisch	photometrisch	
unbehandelt		30,0*	—	28,6	30,1	—
37 °C	5 Tage	27,0	10,0	—	26,0	13,6
	10 Tage	25,3	15,5	—	24,2	19,5
	20 Tage	23,9	20,2	—	23,1	23,2
55 °C	40 Tage	21,7	27,6	—	20,9	30,5
	1 Tag	25,0	16,5	24,4	24,2	19,5
	2 Tage	24,4	18,6	22,8	22,6	25,0
96 °C	4 Tage	17,7	41,0	14,4	17,3	42,5
	0,5 Std.	24,2	19,4	23,4	22,0	26,8
	1,0 Std.	22,2	26,0	22,5	21,7	28,0
	2,0 Std.	21,4	28,6	17,5	12,4	58,8
	4,0 Std.	18,0	40,0	13,8	11,3	62,5

$$\text{Lysingehalt: } \frac{\text{Mol Lysin(-Rest)}}{\text{Mol Protein}}$$

In Tab. 2 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengestellt. Es ist erkennbar, daß bereits die Lagerung bei erhöhten Temperaturen signifikante Verluste an verfügbarem Lysin bewirkt, wobei die Verminderung des nach Säurehydrolyse durch Ionenaustauschchromatographie bestimmten Gesamtlysin [6] nur wenig hinter dem Verlust an »verfügbarem« Lysin zurückbleibt. Die Erhöhung auf 96° bewirkt dagegen bevorzugt eine Blockierung des Lysins, also eine Verminderung des »verfügbaren« Lysins.

* nach FRANK u. BRAUNITZER, HOPPE-SEYLER'S Z. physiol. Chem. 348, 1619 (1971)

** berechnet aus der photometrischen Bestimmung

Gesamtlysin: Ionenaustauschchromatographie nach Säurehydrolyse

II. Enzymatische Angreifbarkeit der Proteine

Außer der Erfassung des verfügbaren Lysins spielen für den ernährungsphysiologischen Wert auch die thermisch bedingten Veränderungen des Proteins eine wichtige Rolle, da sie sich auf die enzymatische Angreifbarkeit auswirken müssen. Hier ist ein Zusammenhang mit der Veränderung des Lysins vorhanden, der den Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen darstellt:

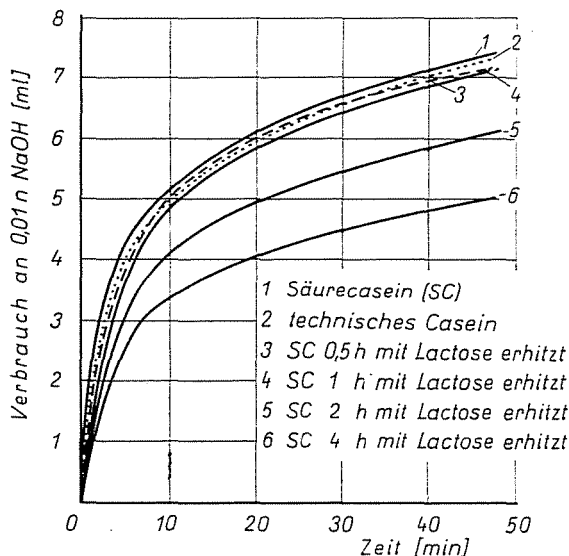


Abb. 1. Verlauf der tryptischen Spaltung von Säurecasein, technischem Casein und mit Lactose erhitztem Säurecasein. 1: Säurecasein (SC). 2: techn. Casein. 3: SC 30 min mit 4 Mol Lactose/ NH_2 auf 96° erhitzt. 4: SC 1 h mit 4 Mol Lactose/ NH_2 auf 96° erhitzt. 5: SC 2 h mit 4 Mol Lactose/ NH_2 auf 96° erhitzt. 6: SC 4 h mit 4 Mol Lactose/ NH_2 auf 96° erhitzt

Trypsin greift nur solche Peptidbindungen des Eiweißmoleküls an, an der die Carboxylgruppen des Lysins oder Arginins beteiligt sind. Eine Hemmung des enzymatischen Angriffes erfolgt bereits durch Substitution der basischen Seitenketten dieser beiden Aminosäuren und auch durch die Anwesenheit von Phosphorsäureresten in der Nachbarschaft der zu spaltenden Bindungen. Daher würde die Verdaulichkeit in vitro durch Trypsin ebenfalls einen Hinweis auf Veränderungen des Lysins ergeben. Verwendet wurde ein Trypsinpräparat der SPOFA, Prag, wobei 1,5 IE/100 mg Protein bei einer Reaktion von pH 7,8 eingesetzt wurde [7].

Durch automatische Titration wurde die Freisetzung der Carboxylgruppen während der Enzymwirkung verfolgt. Ein mit dem Autotitrator gekoppelter Schreiber (Multi-Dosimat E 415, Metrohm Herisau) registrierte

den Verbrauch an 0,01 N $\text{Na}_2\text{tronalauge}$ in Abhängigkeit von der Zeit. Der Alkaliverbrauch muß der Zahl der gespaltenen Peptidbindungen bzw. der entstehenden Protonen proportional sein. Abb. 1 läßt den Verlauf der tryptischen Spaltung von Caseinen erkennen. Daraus ist zu entnehmen, daß die verwendeten Proben nach einer thermischen Behandlung auch in Gegenwart von Lactose zunächst keine Verminderung der enzymatischen Angreifbarkeit aufweisen (Kurve 1—4). Erst nach einer mehr als 2-stündigen Erhitzung auf 96° verringert sich die Spaltbarkeit.

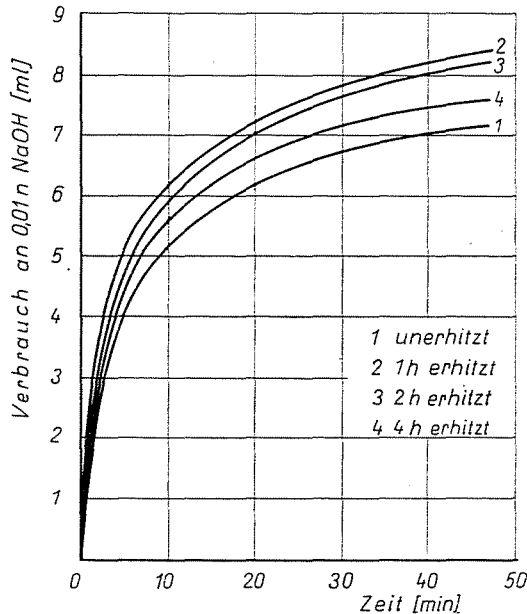


Abb. 2. Verlauf der tryptischen Spaltung von Säurecasein. 1: Kontrolle, 2.: 1 h trocken erhitzt auf 96° . 3: 2 h trocken erhitzt auf 96° . 4: 4 h trocken erhitzt auf 96°

Hierbei ist zu berücksichtigen, daß alle Proteine durchweg nach Denaturierung enzymatisch leichter angreifbar werden [8]. Beim Casein könnte dazu auch noch eine Abspaltung von Phosphorsäureresten beitragen, da diese, wie oben ausgeführt, in Nachbarschaft zu den Angriffspunkten des Enzymes eine Hinderung hervorrufen.

Abb. 2 zeigt, daß in Übereinstimmung mit Literaturangaben [9] eine Verbesserung der Spaltbarkeit herbeigeführt wird, wenn das Casein ohne Lactose erhitzt wurde. Demnach muß bei der Erhitzung in Gegenwart von Lactose mit einer Überlagerung von 2 Effekten gerechnet werden: Durch die thermische Erhitzung erfolgt zunächst eine Verbesserung der enzymatischen Spaltbarkeit. Das Eintreten der MAILLARD-Reaktion und die damit verbundene Substituierung des Lysins erschwert andererseits den Angriff des Enzyms.

Es ist deshalb zu erwarten, daß bei relativ geringer Umsetzung mit reduzierenden Zuckern die Verbesserung der Angreifbarkeit infolge der thermischen Denaturierung überwiegt, während drastische Reaktionsbedingungen oder längeres Erhitzen zu einer Verschlechterung der Spaltbarkeit führen.

III. Kinetische Untersuchungen

Zur besseren Einschätzung des Reaktionsablaufes wurde versucht, die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die hydrolytische Spaltung zu berechnen. Da die Zahl der gebildeten Protonen der Zahl der gespaltenen Bindungen entspricht, kann für den Verlauf der tryptischen Spaltung folgende Gleichung aufgestellt werden.

$$\frac{d[H^+]}{dt} = k'(A_\infty - [H^+]) \quad (1)$$

Durch Integration ergibt sich hieraus

$$\log \frac{1}{|A_\infty - [H^+]|} = k \cdot t + c \quad (2)$$

A_∞ entspricht der maximal erreichbaren Spaltbarkeit, d. h. der bei der Hydrolyse entstehenden H^+ -Konzentration. Es zeigt sich, daß erst nach 10 Minuten langer Einwirkung des Enzyms ein linearer Verlauf der Kurve eintritt. (Abweichungen waren nur bei technischen Caseinen und nach 30 Minuten langer Umsetzung mit Lactose zu beobachten.) Abb. 3 zeigt drei der auf Grund der Gleichung (2) erhaltenen Geraden.

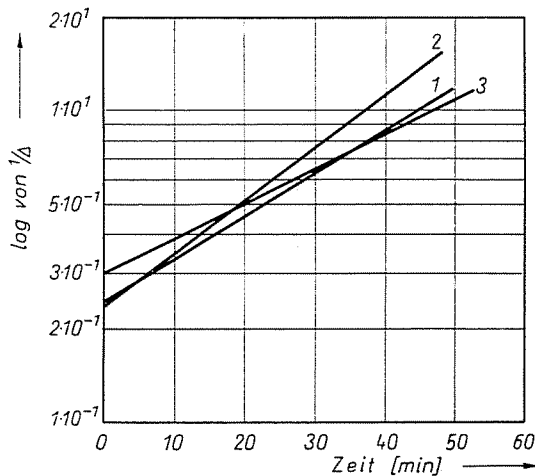


Abb. 3. Darstellung der kinetischen Beziehung. $\log 1/(A_\infty - [H^+]) = kt + C$. 1: Säurecasein. 2: Säurecasein 2 h bei 96° erhitzt. 3: Säurecasein 4 h mit Lactose bei 96° erhitzt Δ : ($A_\infty - [H^+]$)

Die Nichterfüllung der Gleichung (1) bei kürzerer Versuchsdauer als 10 Minuten ist wahrscheinlich auf den gleichzeitigen Ablauf mehrerer Reaktionen zurückzuführen, deren Mechanismus nicht durch die Gleichung (1) wiedergegeben werden kann. Derartige Reaktionen sollten sich durch die Untersuchung der Spaltprodukte nachweisen lassen (vgl. Abschnitt IV).

Aus dem Anstieg der Geraden wird die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die verschiedenen behandelten Caseine errechnet (Abb. 4). Offensichtlich hängt die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k von den Bedingungen der Erhitzung ab. Die Spaltbarkeit nimmt beim Erhitzen ohne Lactose

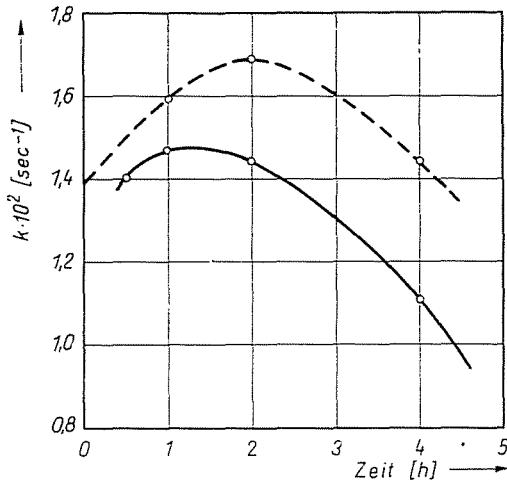


Abb. 4. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von der Erhitzungsdauer. — Säurecasein mit Lactose bei 96° erhitzt. — Säurecasein bei 96° erhitzt

bis zu einem Maximum nach zweistündigem Erhitzen zu und dann wieder ab. Dagegen ruft das Erhitzen in Gegenwart von Lactose eine geringere Verbesserung der Spaltbarkeit bis zu einer Erhitzungsdauer von 1,3 Stunden hervor. Es ist also die Überlagerung der Hitzedenaturierung und der durch die MAILLARD-Reaktion bedingten Effekte deutlich erkennbar. Die Werte für k liegen beim Erhitzen mit Lactose stets niedriger als bei der einfachen thermischen Denaturierung.

IV. Disc-elektrophoretische Untersuchung der tryptischen Peptide

Um die bei der tryptischen Spaltung gebildeten Polypeptide näher zu charakterisieren, wurden während der Titration in bestimmten Zeitabständen Proben entnommen. Nach Inaktivierung des Trypsins durch Eintauchen in ein siedendes Wasserbad untersuchten wir die entstehenden Spaltprodukte

durch disc-Elektrophorese. Die disc-Elektrophorese läßt noch deutlicher als die Untersuchung der Reaktionskinetik die auftretenden Unterschiede in Abhängigkeit von der Vorbehandlung erkennen. Dabei ist das Auftreten und Wiederverschwinden bestimmter Banden charakteristisch. Das Verschwinden der zunächst mit Amidoschwarz angefärbten Banden dürfte auf einer weitergehenden Spaltung dieser Bruchstücke beruhen, die damit ihren eiweißartigen Charakter verlieren. Eine Messung der R_F -Werte ermöglicht eine genauere Charakterisierung. Die langsam wandernden Banden mit $R_F < 0,4$ werden enzymatische nur wenig verändert. Dagegen tritt bei den rasch wandernden

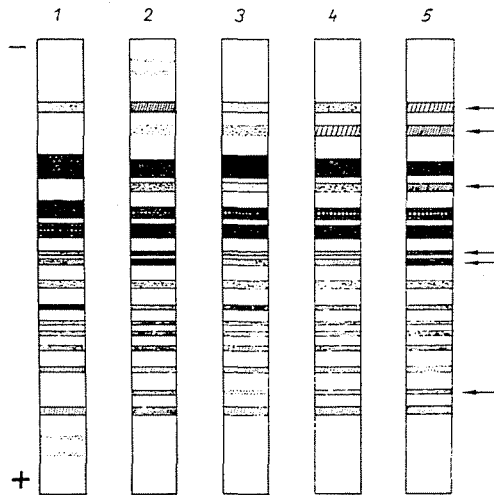


Abb. 5. Schematische Darstellung disc-Elektropherogramm: tryptisches Hydrolysat (wie in Abb 1). 1: Säurecasein. 2: techn. Casein. 3: 30 min mit Lactose erhitzt. 4: 1 h mit Lactose erhitzt. 5: 2 h mit Lactose erhitzt

Banden mit $R_F > 0,6$ schon nach 10 Minuten ein weiterer enzymatischer Abbau ein. Stabil sind dagegen die Banden mit R_F 0,75 und 0,78. Im technischen Casein erfolgt im Gegensatz zum als Vergleichssubstanz selbst hergestellten Säurecasein nur ein langsamer Abbau der schnellen Fraktionen. Es kann angenommen werden, daß diese Proteine durch die großtechnische Darstellung bereits verändert worden sind.

Die schematische Wiedergabe der Abb. 5 und 6 stellt die Peptidmuster nach 1 min und nach 30 min dauernder tryptischer Spaltung dar und läßt die Übereinstimmung im Verhalten der mit Lactose erhitzten Vergleichssubstanzen und dem technischen Casein erkennen.

Es treten resistente Banden auf, die auch nach 45 Minuten dauernder Spaltung noch vorhanden sind und offenbar auf die Reaktion mit Lactose zurückzuführen sind. Sie sind in analoger Weise auch im technischen Casein vorhanden (R^F 0,34—0,128—0,234).

Alle Abweichungen des Peptidmusters im Hydrolysat aus technischem Casein können auf Umsetzungen entsprechend der MAILLARD-Reaktion zurückgeführt werden. Sie treten im Hydrolysat des Säurecaseins nicht auf, können aber durch den Modellversuch mit Lactose gebildet werden.

Die Untersuchungen ergaben ferner, daß nach 4-stündigem Erhitzen mit Lactose keine elektrophoretische Auftrennung mehr erreichbar ist. Das Eiweiß ist dann so stark geschädigt, daß keine Fraktionierung der Peptide mehr erfolgt. Auch nach 45 Minuten dauernder Enzymwirkung erfolgt keine Freisetzung faßbarer Peptide.

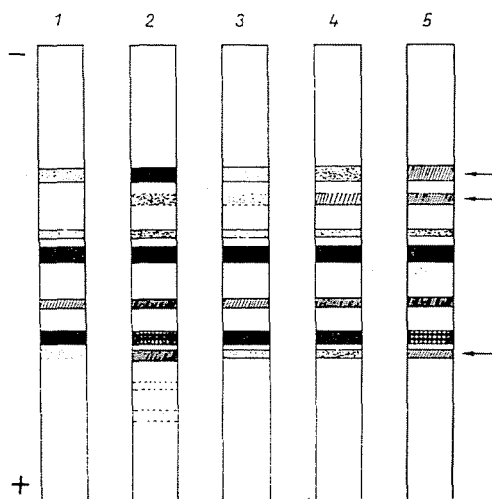


Abb. 6. Schematische Darstellung. Disc-Elektropherogramm: tryptisches Hydrolysat (wie in Abb. 1) nach 30 min Spaltungsdauer 1: Säurecasein. 2: techn. Casein. 3: 30 min mit Lactose erhitzt. 4: 1h mit Lactose erhitzt. 5: 2 h mit Lactose erhitzt

Zusammenfassend kann folgendes festgestellt werden

1. In Modellversuchen zur MAILLARD-Reaktion von Milchproteinen mit Lactose zeigen die isolierten Proteine unterschiedliche Reaktionsbereitschaft der »verfügbaren« Lysinreste. Die höchsten Verluste hat β -Lactoglobulin (63%), den niedrigsten β -Casein (36%).

2. Die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bei der tryptischen Spaltung läßt eine Erhöhung der Spaltbarkeit durch thermische Denaturierung, eine Verminderung infolge der MAILLARD-Reaktion erkennen. Beide Effekte können sich überlagern.

3. Die Untersuchung der durch tryptische Spaltung entstehenden Peptide durch disc-Elektrophorese ergibt charakteristische Banden, deren Auftreten und Wiederabbau in erhitztem bzw. in Gegenwart von Lactose erhitztem Protein einen typischen Verlauf nimmt.

Zusammenfassung

Das tierische Eiweiß deckt in ausreichendem Maße den Bedarf an den essentiellen Aminosäuren, wenn aber die Eiweißversorgung vorwiegend auf pflanzlichen Proteinen beruht, können sich fehlende oder in geringer Menge vorhandene essentielle Aminosäuren als limitierende Faktoren auswirken. Vor allem gilt das für das Lysin, da die Proteine des Weizens und der Kartoffel lysinarm sind. Technologische Maßnahmen können noch Verluste von Lysin auslösen. Die wichtigste Schädigung des Lysins wird durch die Maillard-Reaktion verursacht, da die thermisch bedingten Veränderungen der Proteine auch auf die enzymatische Angreifbarkeit auswirken müssen. Die tatsächlichen Veränderungen wurden in Modellversuchen, durch Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bei der tryptischen Spaltung und durch die Untersuchung der durch tryptische Spaltung entstehenden Peptide mit Disc-Elektrophorese studiert, und es wurden Effekte beobachtet, die sich auch überlagern können.

Literatur

1. LANG, K.: Biochemie der Ernährung, 2. Aufl., Dr. Dietrich-Steinkopff-Verlag, Darmstadt 1970.
2. HEYNS, K. und PAULSEN, H.: Wiss. Veröff. Dtsch. Ges. Ernährung **5**, 15 (1960).
3. REYNOLDS, T. M.: Advances Food Res. **12**, 1 (1963), **14**, 167 (1965)
4. LEA, C. H.: Chem. and Ind. **1950**, 155. LEWIS, V. M. und LEA, C. H.: Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **4**, 532 (1950).
5. LEA, C. H. und HANNAN, R. S.: Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **5**, 433 (1950).
6. TRÜBSBACH, A.: Dissertation TU Dresden, 1968.
7. MATTHIES, K.: Diplomarbeit TU Dresden, Sektion Chemie 1970.
8. PRELLWITZ, W., KRUG, E. und LANG, K.: Biochem. Z. **333**, 236 (1960).

Prof. Dr. U. FREIMUTH, Technische Universität, 8027 Dresden, Mommsenstr.13.
D.D.R.