

VERÄNDERUNGEN AN MILCHPRODUKTEN DURCH
EINWIRKUNG VON KARBONYLVERBINDUNGEN*M. SCHORMÜLLER (WEST-BERLIN)*

Kenntnisse über die Reaktionen zwischen Milchproteinen und Karbonylverbindungen sind besonders aus zwei Gründen von Interesse. Einerseits können essentielle Aminosäuren geschädigt werden, z. B. Lysin. Dadurch tritt eine Minderung des Nährwertes ein. Andererseits können mit solchen Reaktionen unerwünschte geschmackliche Veränderungen verbunden sein. Besonders begünstigt sind solche Reaktionen bei der Herstellung und Lagerung von Vollmilchpulvern. Als Quelle von Karbonylverbindungen kommt dabei in erster Linie die Lipidfraktion in Frage.

Uns interessieren diese Reaktionen zwischen Proteinen und Karbonylverbindungen hauptsächlich im Zusammenhang mit geschmacklichen Veränderungen bei der Lagerung von schaumgetrockneter Vollmilch. Dem sehr schonenden Trocknungsverfahren und der ausgezeichneten Rekonstituierbarkeit steht bei diesem Produkt als Nachteil eine erhöhte Lageranfälligkeit gegenüber. Um derartige Untersuchungen mit Erfolg an Trockenmilch in Angriff nehmen zu können, waren Modellversuche mit Milchprotein und Aldehyden notwendig, da über deren Wechselwirkung im Gegensatz zur vielbearbeiteten Maillard-Reaktion — der Umsetzung von Proteinen und Kohlenhydraten — bis heute nur wenig bekannt ist. Vor allem ging es um die Entwicklung analytischer Verfahren, die solche Reaktionen zu erfassen erlauben. Über solche Versuche mit Kasein und Äthanal soll nun berichtet werden. Das System wurde gewählt, weil Kasein bei homogenisierter Milch einen grossen Teil der Membranproteine ausmacht und weil Äthanal sowohl hinsichtlich seiner Menge als auch hinsichtlich seiner Reaktionsfähigkeit eine besondere Rolle in der Karbonylfraktion von oxydiertem Butterfett spielt.

Kasein wurde nach Hammarsten mit Säure aus Milch frisch gefällt und bei pH 6,5 in wässriger Lösung mit Äthanal bei Zimmertemperatur 2 Std. umgesetzt. Das Protein wurde anschliessend mit Trichloressig-

säure aus der Lösung gefällt, mit Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet.

Mit Hilfe verschiedener im folgenden erörterter analytischer Verfahren wurden nun die Eigenschaften des Proteins vor und nach der Umsetzung mit Äthanal untersucht. Das nicht umgesetzte, frisch gefällte Kasein wird im folgenden als C_U (Casein, unreacted), das mit Äthanal umgesetzte Kasein als C_R (Casein, reacted) bezeichnet.

Grosse Unterschiede zwischen C_U und C_R zeigen sich bei der Fraktionierung an Ionenaustauschersäulen. Gearbeitet wurde in Anlehn an Yaguchi (1961) mit DEAE-Cellulose. Die Elution erfolgte mit Phosphatpuffern steigender NaCl-Konzentration bei pH 7, schliesslich mit 0,1 n — bis n-NaOH.

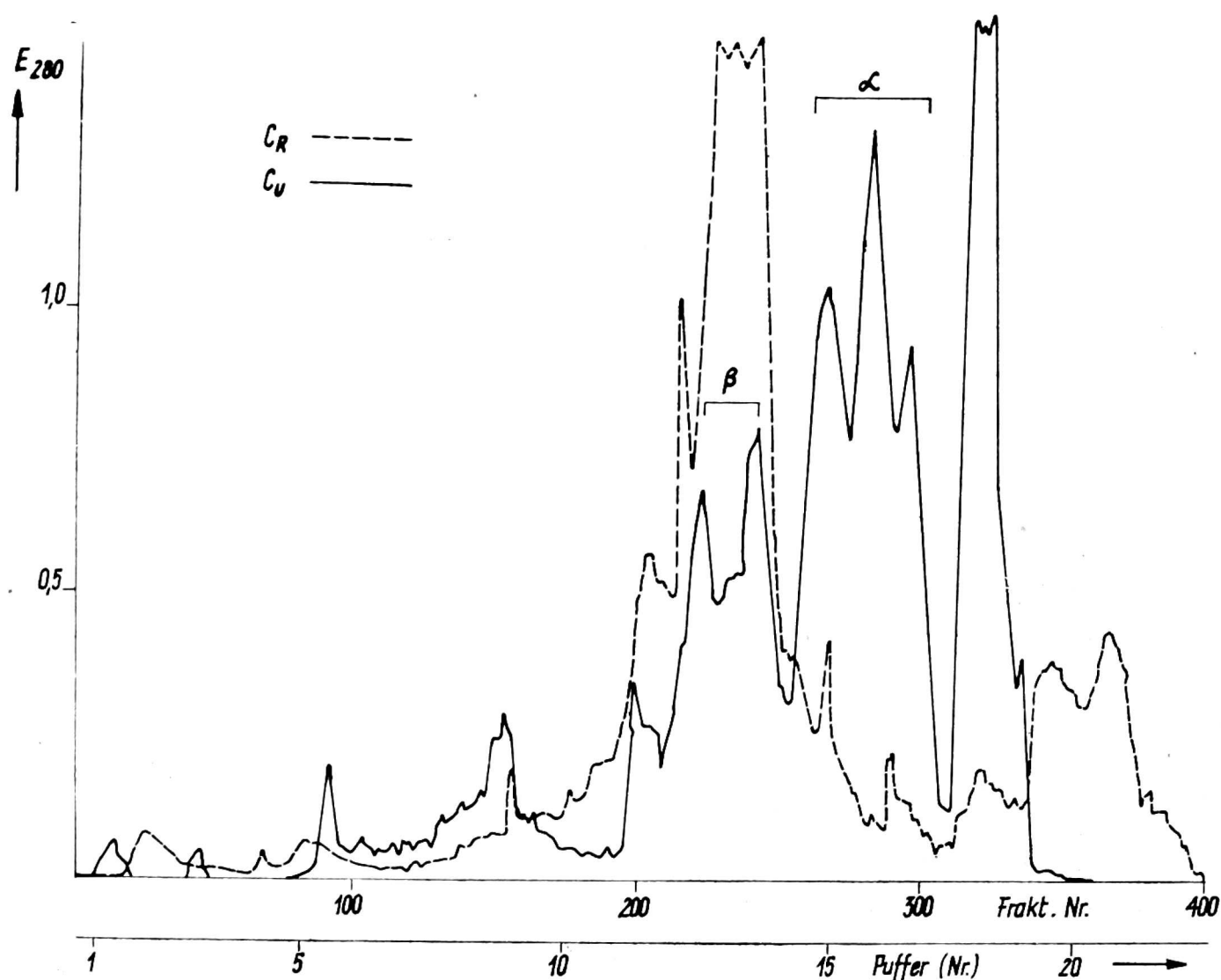


Abb. 1. Trennung von C_U und C_R an DEAE-Zellulose

Das Chromatogramm von C_U lässt nach einigen Vorgipfeln zwei Gruppen von Peaks erkennen, die dem β -Kasein und dem β -Kasein-Komplex entsprechen. Diese weitgehende Differenzierung ist bei C_R also nach der Reaktion mit Äthanal, aufgehoben. Praktisch das gesamte Protein

erscheint in einem grossen Gipfel etwa in der Position des β -Kaseins im Eluat.

Auch die für ihr hohes Auflösungsvermögen bekannte Elektrophorese in Polyarylamidgel lässt eine solche Vereinfachung des Bildes bei C_R gegenüber C_U erkennen.

Bei C_U sind neben einer nicht auswandernden Startzone sieben Banden zu sehen, von denen vier dem β -Kasein und drei dem α -Kasein zuzordnen sind. Neben der auch hier auftretenden Startzone zeigt C_R dagegen nur zwei Banden, davon eine im Bereich des β -Kasein und die stärkere im Bereich des α -Kaseins.

Diese säulenchromatographischen und elektrophoretischen Befunde deuten auf Aggregation der Kaseinfraktionen, offenbar zurückzuführen auf Quervernetzungen von Peptidketten durch die Einwirkung von Äthanal. Es war deshalb von Interesse zu prüfen, ob Äthanalwirkung mit einer Änderung der Molekülgrösse verbunden ist.

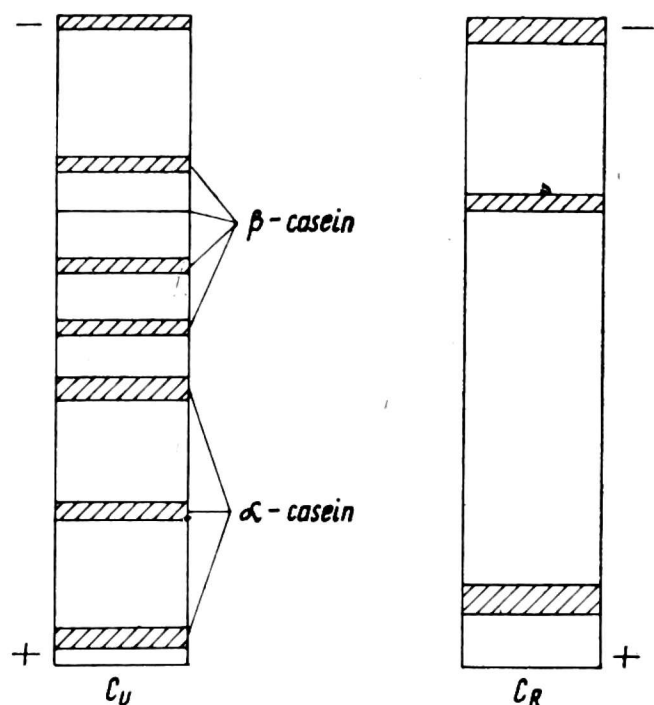


Abb. 2. Elektrophorese von C_U und C_R in Polyacrylamidgel (Bedingungen: Veronalpuffer pH 8,9 Γ (2 = 0,05, 4,3 m an Harnstoff, 20 V/cm, 45 min.)

Zunächst wurden zu diesem Zweck Sedimentationsversuche in einer präparativen Ultrazentrifuge (Spinco, Modell L) durchgeführt. In Anlehnung an Martin und Ames (1961) wurde im Winkelrotor in einem linearen Zuckergradienten gearbeitet. Nach beendeter Zentrifugation wurden die Zelluloidröhrchen sehr vorsichtig aus dem Rotor genommen und am Boden mit einer Nadel angestochen. Die ausfliessende Lösung wurde in kleinen Fraktionen (0,55 ml) gesammelt. Kontrollversuche mit einer Farbstofflösung zeigen, dass mit dieser Methodik bei entsprechender Sorgfalt reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

In Bild 3 sind Sedimentationsdiagramme von C_U und C_R nach Laufzeiten von 5, 8 und 16 Stunden bei etwa 110 000 g zu sehen. In allen Fällen sind zwei Hauptbanden vorhanden. C_R und C_U zeigen aber deutliche Unterschiede: bei C_R ist die schneller sedimentierende Bande durchweg stärker ausgeprägt als die langsamer sedimentierende. Für C_U gilt das Umgekehrte.

Durch Gelfiltration konnte bestätigt werden, dass durch Äthanalwirkung auf Kasein höhermolekulare Produkte entstehen. Die Versuche

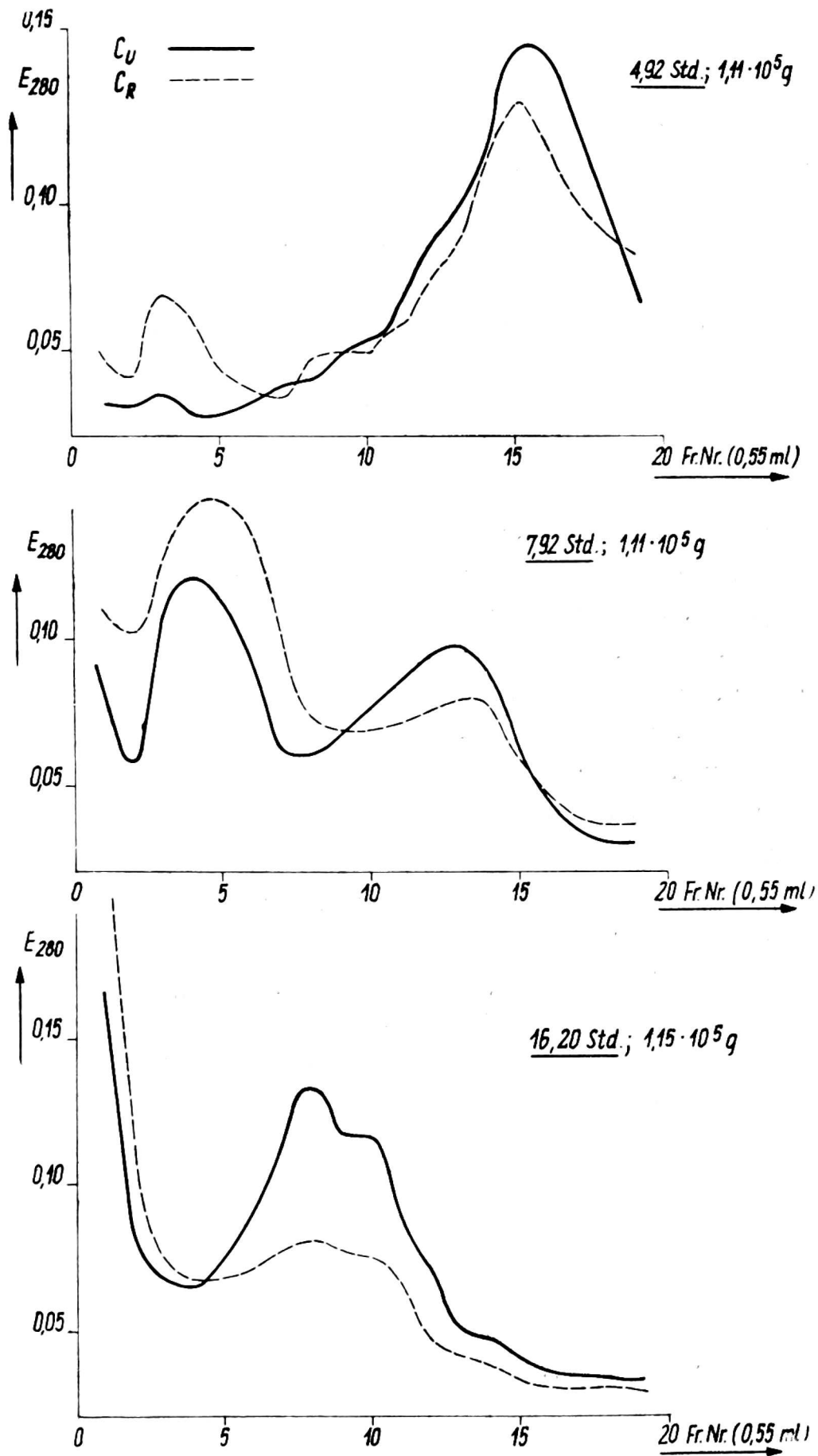


Abb. 3

wurden mit Sephadex G 100 durchgeführt, das Fraktionierungen im Molekulargewichtsbereich von 5 000 bis 100 000 gestattet. Die Sephadexsäule wurde zunächst mit einer Reihe von Proteinen bekannten Mo-

lekulargewichte kalibriert. Dazu wurden die K_d -Werte dieser Proteine bestimmt. Der K_d -Wert gibt den Bruchteil des „inneren Volumens“ der Gelsäule an, der einer Substanz zugänglich ist. Es gilt die folgende Beziehung:

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i$$

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} = f(M)$$

V_e ist darin das Elutionsvolumen der betrachteten Substanz; V_o ist das „äussere Volumen“ der Gelsäule, d. h. das Volumen, nach dem eine Substanz im Eluat erscheint, die nicht in die Netzstruktur der Gelkörner eindringen kann; V_i ist das „innere Volumen“, d. h. es entspricht dem in den Gelkörnern befindlichen Wasser. Das Elutionsvolumen eines Stoffes setzt sich aus dem äusseren Volumen und dem durch K_d angegebenen Bruchteil des inneren Volumens zusammen. Für $K_d = 1$ wird $V_e = V_o + V_i$, d. h. der betrachtete Stoff ist so niedermolekular, dass ihm das gesamte Wasser der Gelsäure zur Verfügung steht. K_d ist also eine von der Molekülgrösse abhängige Stoffkonstante (selbstverständlich

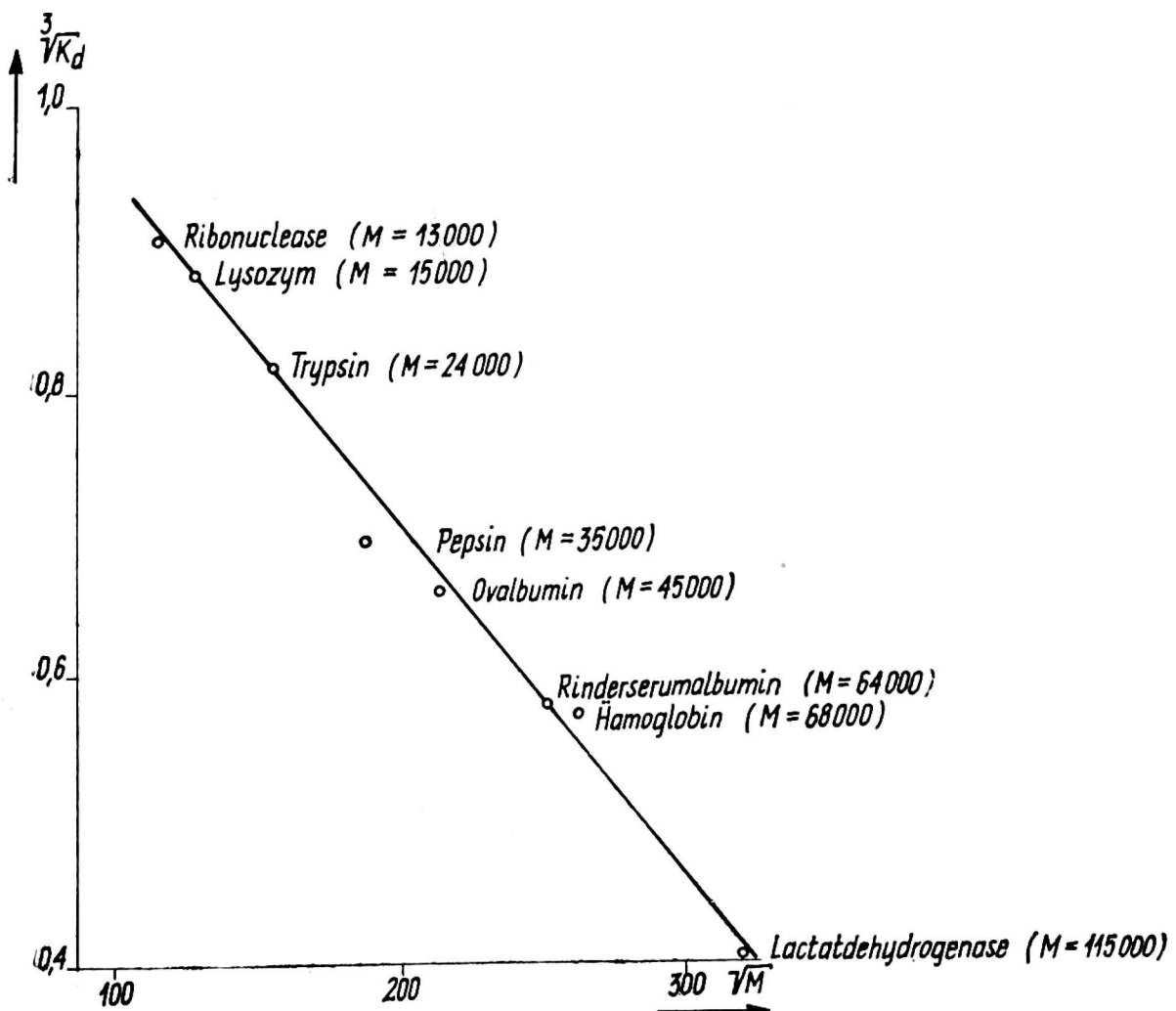


Abb. 4. Gelfiltration von Protein

nur für jeweils einen Geltyp mit einem definierten Vernetzungsgrad). Nach Arbeiten von Porath (1963) und Wieland (1963) besteht für Polysaccharide und auch für Proteine ein linearer Zusammenhang zwischen K_d -Wert und Molekulargewicht, wenn die dritte Wurzel aus dem K_d -Wert gegen die zweite Wurzel aus dem Molekulargewicht aufgetragen wird.

Bild 5 gibt eine derartige Eichkurve wieder von acht Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 13 000 bis 115 000 für 115 000 für Sephadex G 100. Alle gemessenen K_d -Werte liegen in guter Näherung auf einer Geraden. Mit Hilfe dieser Eichmessungen waren nun angenährte

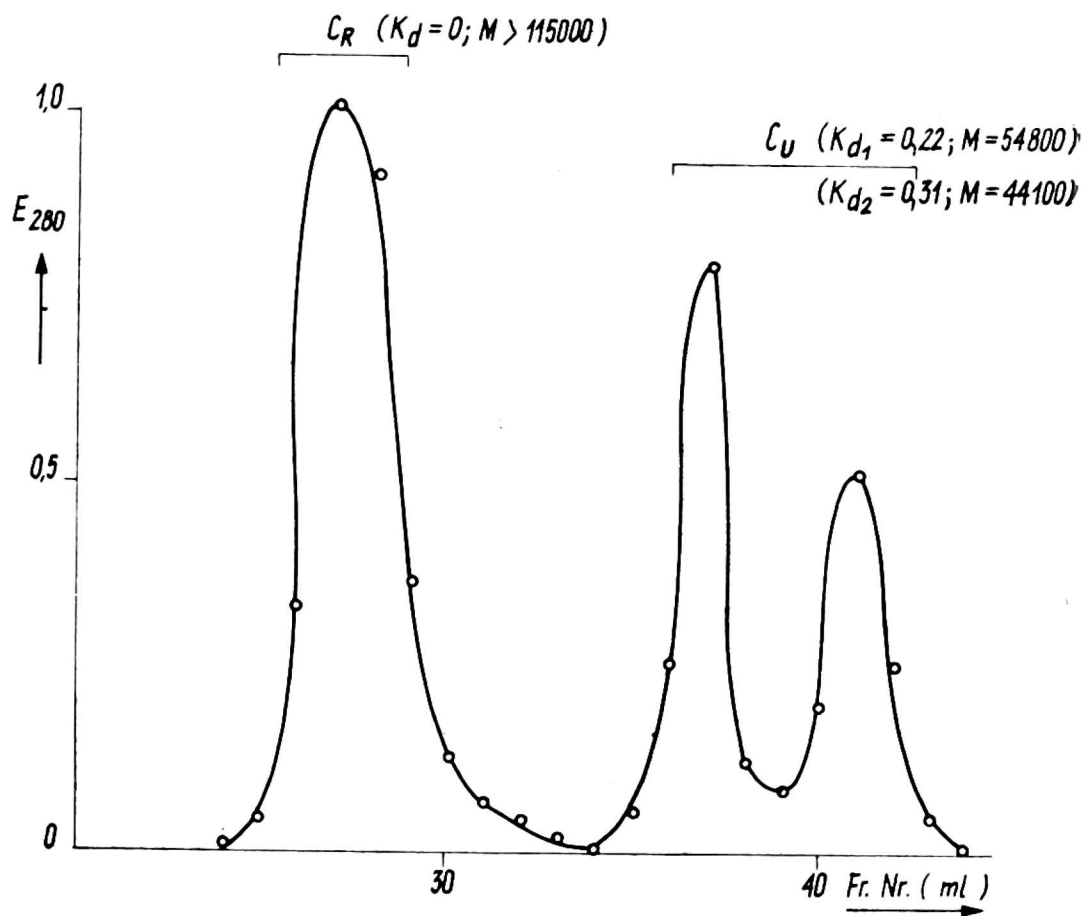


Abb. 5. Geldfiltration von C_U und C_R an Sephadex G 100

Aussagen über das Molekulargewicht von Kasein vor und nach der Reaktion mit Äthanal möglich.

Bild 6 zeigt ein Elutionsdiagramm von C_U und C_R an Sephadex G 100. Gearbeitet wurde — wie bei Aufstellung der Eichkurve — bei Zimmertemperatur in 0,02 m-Phosphatpuffer vom pH 7,2, der dazu 0,8 m an Ammonsulfat war. Kasein selbst (C_U) spaltet an Sephadex G 100 unter diesen Bedingungen in zwei Gipfel auf. Den K_d -Werten von 0,22 und 0,31 entsprechen Molekulargewichte von 54 800 und 44 100. Hippel und Waugh (1955) geben aus Sedimentationsanalysen für monomeres α -Kasein ein Molekulargewicht von 13—15 000, für monomeres β -Kasein ein Molekulargewicht von 15—25 000 an. Diesen Angaben liegen Messungen bei pH 12 und 0°C zugrunde. Mit sinkendem pH-Wert und steigender

Temperatur traten in zunehmendem Masse polymere Formen auf. Bei den an Sephadex G 100 bei pH 7 und Zimmertemperatur erhaltenen zwei peaks muss es sich demnach um di- bis tetramere Formen von α - und β -Kasein, evtl. auch um Mischformen aus beiden Kaseinfraktionen handeln.

Das mit Äthanal behandelte Kasein C_R erscheint in einem peak im Eluat und hat einen K_d -Wert von 0; das Molekulargewicht ist demnach grösser als 115 000. Versuche an Sephadex G 200 sind im Gange und sollen zeigen, ob im Bereich 100 000 bis 200 000 eine Aufspaltung von C_R eintritt. Auf jeden Fall folgt aus den Gelfiltrationsversuchen, dass die Einwirkung von Äthanal auf Kasein zu hochmolekularen Produkten führt.

Als Angriffspunkte für derartige Quervernetzungen sind in erster Linie freie NH_2 -Gruppen anzusehen. Um diese Frage zu klären, wurden C_U und C_R mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol umgesetzt.

Aus Bild 7 geht hervor, dass die Zahl der reaktionsfähigen $E-NH_2$ -Gruppen von Lysinresten bei C_R gegenüber C_U deutlich vermindert ist.

	Lysin	F-DNP-Lysin
C_U	59	31
C_R	57	25

Reaktion von C_U und C_R mit FDNB (alle Werte in mol (16 000 g N))

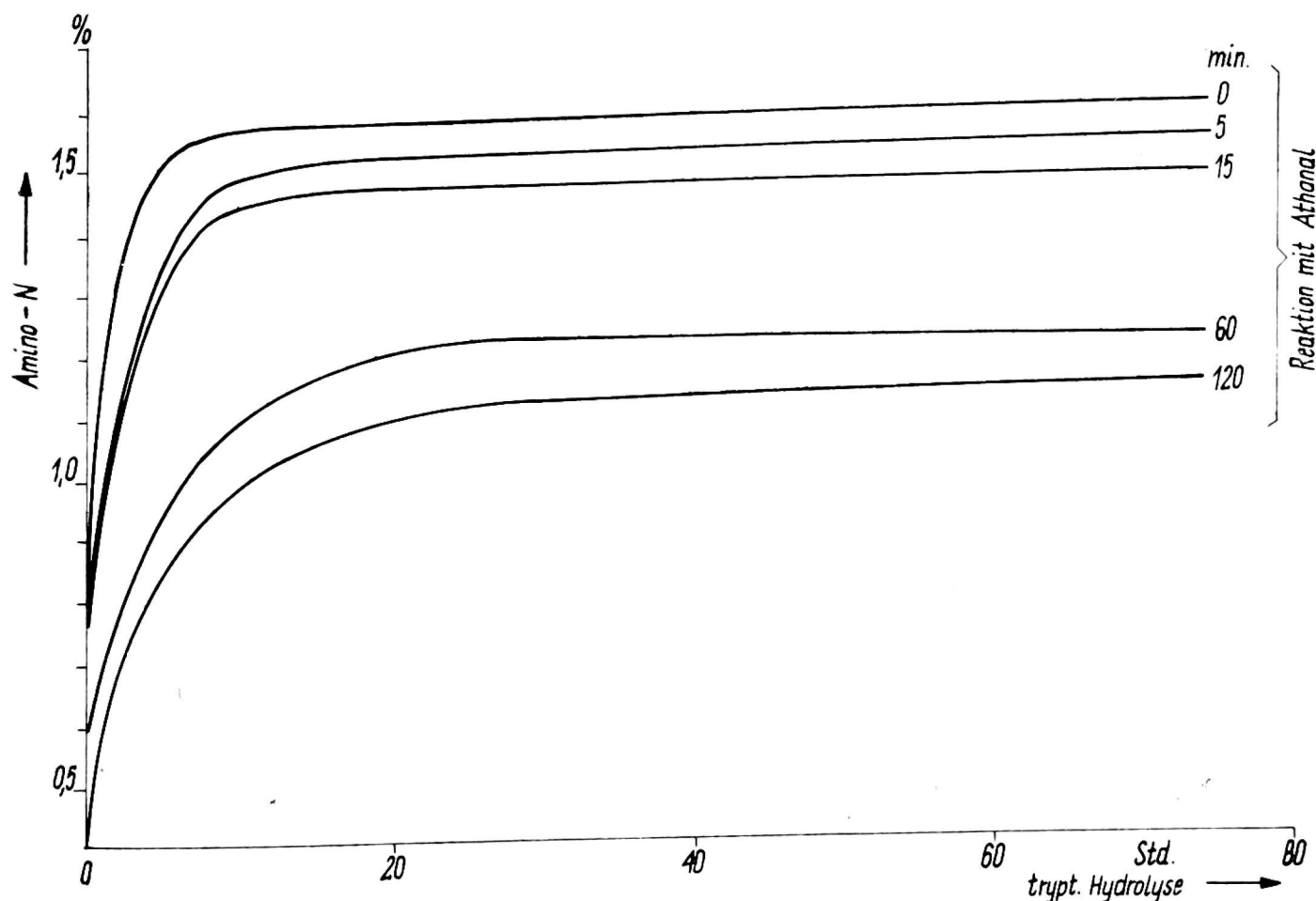


Abb. 6. Tryptische Hydrolyse von Kasein nach Reaktion mit Äthanol

Bei C_U reagieren 53% der vorhandenen Lysinreste mit FDNB, bei C_R nur 44%.

Diese Blockierung von $E-NH_2$ -Gruppen hat Rückwirkungen auf die enzymatische Hydrolyse des Kaseins. Trypsin spaltet bekanntlich selektiv Lysyl- und Arginyl-Bindungen. Nach den Vorstellungen von Fölsch und Österberg (1961) sind die $N-NH_2$ - bzw. E -Guanidyl-Gruppen für die Anlagerung des Substrates in der richtigen Position zum Enzymprotein verantwortlich. Blockierung dieser Gruppen muss also von einer Verminderung der Proteinhydrolyse begleitet sein.

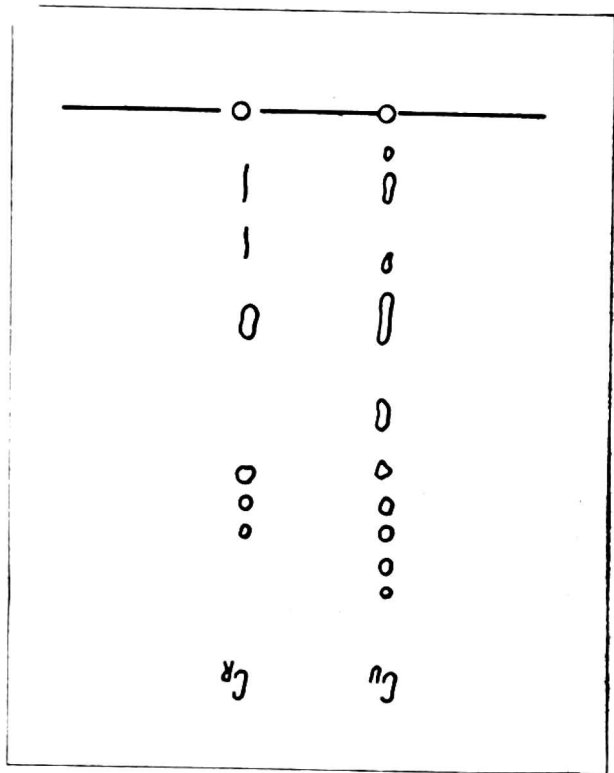


Abb. 7. Dünnschichtchromatographie tryptischer Hydrolysate von C_U und C_R . Träger: Kieselgel G. Fließmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1). Sprühreagenz: Ninhydrin

Hydrolysats von C_R (2 Std. Reaktion mit Äthanal) weniger ninhydrinpositive Verbindungen auf, als das Kontrollchromatogramm von C_U .

Die Verminderung der Affinität Substrat-Enzym drückt sich in einer starken Erhöhung der Michaeliskonstanten aus: die Konstante steigt von 2,18% bei C_U auf 3,77% bei C_R .

$$C_U : K_M = 2,12\%$$

$$C_R : K_M = 3,77\%$$

Michaelis-Konstanten für die Reaktion Trypsin/Kasein

Die Modellversuche mit Kasein und Äthanal zeigen, dass das Protein starken Veränderungen seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften unterliegt. Diese Veränderungen sind von den verschiedenen Seiten her analytisch erfassbar. Die Übertragung der Methoden auf die — für Reaktionen mit Karbonylverbindungen aus Lipiden prädestinierten — Membranproteine aus Milchpulvern soll in den zur Zeit noch laufenden Arbeiten zur Klärung der eingangs erwähnten Probleme beitragen.

Streszczenie

MODYFIKACJE BIAŁEK MLEKA POD WPŁYWEM ZWIĄZKÓW
KARBONYLOWYCH

M. SCHORMÜLLER (WEST-BERLIN)

Modyfikacje smaku występujące podczas przechowania mleka w proszku, otrzymanego przez suszenie w stanie spienionym mleka pełnego, są częściowo z pewnością spowodowane reakcjami między białkami membrany i związkami karbonylowymi, powstałymi w wyniku utlenienia lipidowego. Do badań podjętych w tym celu posłużono się w sposób zasadniczy zachowaniem się kazeiny pod wpływem etanolu. Właściwości chromatograficzne i elektroforetyczne białek ulegają silnym zmianom.

Ciężar cząsteczkowy kazeiny wchodzącej w reakcję wzrasta do 115 000. Przyczynę tych modyfikacji stanowi z pewnością powstawanie poprzecznych wiązań między łańcuchami peptydowymi, ponieważ zmniejsza się równie wyraźnie ilość grup aminowych wchodzących w reakcję z fluoro-dwunitrobenzenem. Równocześnie stwierdza się, że kazeina wchodząca w reakcję jest słabiej atakowana przez trypsynę, co znajduje m.in. wyraz w podwojeniu stałych Michaelisa. Opisane metody analityczne pozwalają na identyfikację białek membrany w mleku pełnym w proszku, suszonym w postaci spienionej.

Résumé

MODIFICATIONS DES PROTÉINES DU LAIT PAR ACTION DES
COMPOSÉS CARBONYLÉS

M. SCHORMÜLLER (BERLIN-OUEST)

Les modifications de la saveur lors du stockage des poudres de lait entier séchées sous forme de mousse, sont en partie certainement dues aux réactions entre les protéines de membrane et les composés carbonylés de l'oxydation lipidique. Pour les essais dans cette orientation on a choisi comme base le comportement de la caséine sous l'action de l'éthanol. Les propriétés chromatographiques et électrophorétiques des protéines subissent de fortes modifications.

Le poids moléculaire de la caséine entrant en réaction augmente à des valeurs de 115 000. La raison de ces modifications est certainement la création de liaisons transversales entre des chaînes peptidiques, car le nombre des groupes aminés entrant en réaction avec le fluor-dinitrobenzène est aussi nettement diminué. En même temps on constate que la caséine entrant en réaction est moins attaquée par la trypsine, ce qui s'exprime entre autre par un dédoublement des constantes de Michaelis. Les méthodes analytiques décrites permettent l'identification des protéines de membrane dans la poudre de lait entier, séchée sous forme de mousse.

S u m m a r y

ALTERATIONS OF MILK PROTEINS UNDER THE EFFECT OF
CARBONYL COMPOUNDS

M. SCHORMÜLLER (WEST-BERLIN)

The changes during storage in the flavor of foam dried whole milk powders are certainly partly due to the reaction between membrane proteins and the carbonyl compounds resulting from lipid oxidation. In order to investigate this approach, the behaviour of casein under the effect of ethanol was chosen as a basis. The chromatographic and electrophoretic properties of the proteins undergo deep alterations. The molecular weight of the reacting casein increases to more than 115 000. The cause of these changes is certainly the creation of transversal bonds between peptide chains, since the number of aminogroups reacting with the fluor-dinitrobenzene is also notably diminished. At the same time, it may be seen that the reacting casein is attacked, to a lesser degree, by trypsin which is marked, among others, by a splitting of Michaelis constants. The described analytical methods permit the identification of membrane proteins in whole milk foam dried powders.

Z u s a m m e n f a s s u n g

VERÄNDERUNGEN AN MILCHPROTEINEN DURCH EINWIRKUNG
VON CARBONYLVERBINDUNGEN

M. SCHORMÜLLER (WEST-BERLIN)

Geschmackische Veränderungen bei der Lagerung schaumgetrockneter Vollmilchpulver gehen wahrscheinlich zum Teil auf Reaktionen zwischen Membranproteinen und Carbonylverbindungen aus der Fettoxydation zurück. Als Basis für Arbeiten in dieser Richtung wurde das Verhalten von Kasein bei Einwirkung von Äthanol untersucht. Die chromatographischen und elektrophoretischen Eigenschaften des Proteins ändern sich stark. Das Molekulargewicht des umgesetzten Kaseins ist auf Werte $> 115\,000$ erhöht. Zurückzuführen sind diese Änderungen wahrscheinlich auf eine Quervernetzung von Peptidketten, denn auch die Zahl der mit Fluordinitrobenzol reagierenden Aminogruppen ist deutlich herabgesetzt. Verbunden damit ist eine verminderte Angreifbarkeit des umgesetzten Kaseins durch Trypsin, die sich u. a. in einer Verdoppelung der Michaeliskonstanten ausdrückt. Die geschilderten analytischen Methoden erlauben eine Charakterisierung der Membranproteine in gelagerter schaumgetrockneter Vollmilch.

Резюме

МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ МОЛОКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ
КАРБОНИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

М. ШОРМЮЛЛЕР (ЗАП. БЕРЛИН)

Изменение вкусовых качеств, наблюдаемое во время хранения молочного порошка, получаемого методом сушки цельного молока во вспененном состоянии, несомненно, в известной степени вызваны реакциями, протекающими между белками мембраны и карбонильными соединениями, возникающими в результате липридного окисления. Для исследования этого явления наблюдали за поведением казеина под действием этанала. Хроматографические и электрофоретические свойства белков при этом заметно изменяются.

Молекулярный вес казеина, участвующего в реакции, возрастает до 115 000. Причиной этих модификаций является несомненно возникновение поперечных связей между цепями пептидов, так как наряду с этим заметно уменьшается количество аминогрупп, реагирующих с фтординитробензолом. Кроме того, найдено, что казеин участвующий в реакции, слабее поддается действию трипсина, что отражается, в частности, на увеличении вдвое констант Михаэлиса. Описанные аналитические методы дают возможность определить белки мембраны и цельном молочном порошке, сушенном во вспененном состоянии.